

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Martin Reincke**



**Charakterisierung von Hypoxie-responsiven mesenchymalen Stammzellen
unter Verwendung des Natrium-Iodid-Symporters als Reporter- und
Therapiegen**

**Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Naturwissenschaften
an der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

**vorgelegt von
Andrea Maria Müller
aus Heilbronn**

2017

**Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Betreuer:	Prof. Dr. rer. nat. Peter Jon Nelson
Zweitgutachter:	Prof. Dr. rer. nat. Heiko Hermeking
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel
Tag der mündlichen Prüfung:	03.08.2017

Für meine Eltern, meine Schwester und meinen Freund Patrick

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	VII
Tabellenverzeichnis.....	X
Abkürzungsverzeichnis.....	XII
Zusammenfassung.....	1
Summary	3
1 Einleitung.....	5
1.1 Krebs und das hepatozelluläre Karzinom.....	5
1.2 Tumorbilogie	5
1.2.1 Aufbau des Tumorstromas.....	5
1.2.2 Schlüsselmerkmale von Krebs.....	8
1.3 Tumorphypoxie	9
1.3.1 Hypoxieantwort der Zelle.....	9
1.3.2 Therapie hypoxischer Tumorzellen	11
1.4 Gentherapie	12
1.5 MSCs.....	14
1.6 Natrium-Iodid-Symporter.....	17
1.6.1 Funktion von NIS	17
1.6.2 NIS als Reporter- und Therapiegen	17
1.6.3 NIS-Genstransferkonzepte.....	20
1.7 Genomische und nicht-genomische Effekte von Schilddrüsenhormonen.....	23
1.8 Effekte von Schilddrüsenhormonen auf die HIF-1 α -Expression und -Stabilisierung	26
1.9 Hypo- und athyreote Tiermodelle.....	27
1.10 Ziele der Arbeit.....	29
2 Material und Methoden	31
2.1 Materialien	31
2.1.1 Verbrauchsmaterialien.....	31

2.1.2	Plasmide und Vektoren	32
2.1.3	Zelllinien und primäre Zellen.....	32
2.1.4	Kulturmedien und Zusätze für die Zellkultur	34
2.1.4.1	Zellkulturmedien	34
2.1.4.2	Zellkulturzusätze	34
2.1.4.3	Andere Zellkulturreagenzien	35
2.1.5	Bakterien und Wachstumsmedien	35
2.1.5.1	Bakterien	35
2.1.5.2	Wachstumsmedien für Bakterien.....	35
2.1.6	Chemikalien und Reagenzien	36
2.1.7	Radionuklide.....	38
2.1.8	Puffer, Lösungen und Gele	38
2.1.8.1	Kommerziell erworben.....	38
2.1.8.2	Selbst hergestellt.....	40
2.1.9	Enzyme	40
2.1.10	Elektrophoresestandards	41
2.1.11	Antikörper	41
2.1.11.1	Primäre Antikörper.....	41
2.1.11.2	Sekundäre Antikörper	42
2.1.12	Kits und Zubehör	42
2.1.13	<i>Primer</i>	43
2.1.14	Mäuse.....	44
2.1.15	Materialien und Reagenzien für Tierversuche	44
2.1.16	Geräte.....	45
2.1.17	Sonstiges.....	47
2.1.18	Software	47
2.1.19	Internetseiten.....	48
2.2	Methoden.....	48

2.2.1	<i>In vitro</i> Experimente	48
2.2.1.1	Herstellung des pGL3-HIF-NIS-Vektors.....	48
2.2.1.1.1	Restriktionsverdau der Vektoren	48
2.2.1.1.2	Auftrennung der DNA-Fragmente über Agarosegelelektrophorese.....	49
2.2.1.1.3	Extraktion der DNA-Fragmente aus dem Agarosegel	49
2.2.1.1.4	Ligation der DNA-Fragmente	49
2.2.1.1.5	Transformation der DNA-Fragmente in kompetente Bakterien.....	49
2.2.1.1.6	Herstellung von Agarplatten	50
2.2.1.1.7	Herstellung von Glycerinstocks.....	50
2.2.1.1.8	DNA-Minipräparation.....	50
2.2.1.1.9	Kontrollrestriktionsverdau des Vektors	50
2.2.1.1.10	DNA-Maxipräparation.....	50
2.2.1.1.11	Bestimmung der DNA-Konzentration	50
2.2.1.1.12	DNA-Sequenzierung	51
2.2.1.2	Methoden im Rahmen der Zellkultur.....	51
2.2.1.2.1	Zellkultur	51
2.2.1.2.2	Passagieren von Zellen.....	51
2.2.1.2.3	Einfrieren von Zellen	51
2.2.1.2.4	Auftauen von Zellen	52
2.2.1.2.5	Zellquantifizierung	52
2.2.1.3	Generierung der HIF-NIS-MSCs und der HIF-NIS-HuH7	52
2.2.1.3.1	Toxizitätstest	52
2.2.1.3.2	Transfektion	52
2.2.1.3.3	Einzelklonselektion.....	53
2.2.1.4	Stimulation von Zellen mit Schilddrüsenhormonen.....	53
2.2.1.4.1	Herstellung von Hormon-reduziertem FBS (csFBS).....	53
2.2.1.4.2	Herstellung von konditioniertem HuH7 Medium (cHuH7M).....	53
2.2.1.4.3	Stimulation von Zellen mit Schilddrüsenhormonen	54

2.2.1.5	Vorbereitung der Zellen für die <i>in vivo</i> Applikation	54
2.2.1.6	Analyse der Genexpression	55
2.2.1.6.1	RNA-Extraktion	55
2.2.1.6.2	cDNA-Synthese	55
2.2.1.6.3	Entwurf von <i>Primer</i>	56
2.2.1.6.4	qRT-PCR	56
2.2.1.7	¹²⁵ I-Uptake Assay	57
2.2.1.8	Testung der Zellviabilität	57
2.2.1.9	Analyse der Proteinexpression	58
2.2.1.9.1	Proteinextraktion	58
2.2.1.9.2	Proteinbestimmung	58
2.2.1.9.3	Western Blot	58
2.2.1.10	Zellinvasion in Sphäroide	59
2.2.2	<i>In vivo</i> Experimente	59
2.2.2.1	Tierhaltung	59
2.2.2.2	Etablierung von Tumoren	60
2.2.2.2.1	Etablierung von subkutanen Tumoren	60
2.2.2.2.2	Etablierung von orthotopen Tumoren	60
2.2.2.3	Bildgebende Verfahren	61
2.2.2.3.1	¹²³ I-Szintigraphie	61
2.2.2.3.2	¹²⁴ I-/ ¹⁸ F-TFB-PET	62
2.2.2.4	Vorbereitung der Mäuse für die 3D-Lichtblattfluoreszenzmikroskopie	62
2.2.2.5	¹³¹ I-Therapie	63
2.2.2.6	CEUS	63
2.2.2.7	Schilddrüsenablation	64
2.2.2.8	Blutentnahme	64
2.2.2.9	^{99m} Tc-Pertechnetat-Szintigraphie	65
2.2.3	<i>Ex vivo</i> Experimente	65

2.2.3.1	<i>Ex vivo</i> ¹²³ I-Biodistributionsanalyse	65
2.2.3.2	Anfertigung von Gefrierschnitten	65
2.2.3.3	Anfertigung von Paraffinschnitten	65
2.2.3.4	Immunhistochemische Färbungen	66
2.2.3.4.1	Hämatoxylin-Eosin- (HE-) Färbung	66
2.2.3.4.2	NIS-Färbung	66
2.2.3.4.3	<i>SV40 large T antigen</i> -Färbung	67
2.2.3.5	Immunfluoreszenzfärbungen	67
2.2.3.5.1	NIS- und CD31-Färbung	67
2.2.3.5.2	Ki67- und CD31-Färbung	68
2.2.4	Statistische Analysen	69
3	Ergebnisse	70
3.1	<i>In vitro</i> Charakterisierung der HIF-NIS-MSCs	70
3.2	Analyse der Hypoxie-induzierten NIS-Expression in einem subkutanen HuH7 Xenograftmausmodell	73
3.3	Analyse der Hypoxie-induzierten NIS-Expression in einem orthotopen HuH7 Xenograftmausmodell	80
3.4	3-dimensionale Analyse der Tumervaskularisierung und der MSC-Rekrutierung in das Tumorstroma	88
3.5	Analyse der Effekte von Schilddrüsenhormonen auf das Hypoxie-responsive Netzwerk in MSCs	91
3.6	Entwicklung eines Protokolls zur Radioiodablation der Mausschilddrüse	98
4	Diskussion	102
4.1	MSC-vermittelte, Hypoxie-induzierte NIS-Expression für bildgebende Darstellungen und eine Radionuklidtherapie	102
4.2	3-dimensionale Analyse der Tumervaskularisierung und der MSC-Rekrutierung in das Tumorstroma	108
4.3	Effekte von Schilddrüsenhormonen auf das Hypoxie-responsive Netzwerk in MSCs ...	111
4.4	Entwicklung eines Protokolls zur Radioiodablation der Mausschilddrüse	114
5	Publikationen und Präsentationen	116

5.1	Veröffentlichte Manuskripte.....	116
5.2	Manuskripte in Vorbereitung.....	116
5.3	Vorträge	117
5.4	Posterpräsentationen.....	118
5.5	Reisekostenstipendien	118
6	Literaturverzeichnis	120
7	Danksagung	140
8	Eidesstattliche Versicherung	142

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung des Tumorstromas.	8
Abb. 2: Schematische Darstellung der Regulation von HIF-1 α	11
Abb. 3: Schematische Darstellung der Rolle von NIS als Reporter- und Therapiegen.	20
Abb. 4: Nicht-genomische, Integrin $\alpha\beta 3$ -vermittelte Schilddrüsenhormoneffekte.	26
Abb. 5: Schilddrüsenhormon-basierte Regulation von HIF-1 α	27
Abb. 6: Schematische Darstellung des pGL3-HIF-NIS-Vektors.	70
Abb. 7: NIS-Expression in HIF-NIS-MSCs nach CoCl ₂ Stimulation.	71
Abb. 8: NIS-vermittelte ¹²⁵ I-Aufnahme in HIF-NIS-MSCs nach CoCl ₂ Stimulation.	71
Abb. 9: Hypoxie-induzierte, NIS-vermittelte ¹²⁵ I-Aufnahme in HIF-NIS-MSCs nach Invasion in das hypoxische Zentrum von HuH7 Sphäroiden.	72
Abb. 10: Hypoxie-induzierte, NIS-vermittelte ¹²³ I-Aufnahme im Tumor nach intravenöser Applikation der HIF-NIS-MSCs in ein subkutanes HuH7 Xenograftmausmodell.	74
Abb. 11: Hypoxie-induzierte, NIS-vermittelte ¹²⁴ I-Aufnahme im Tumor nach intravenöser Applikation der HIF-NIS-MSCs in ein subkutanes HuH7 Xenograftmausmodell.	75
Abb. 12: Hypoxie-induzierte, NIS-vermittelte ¹⁸ F-TFB-Aufnahme im Tumor nach intravenöser Applikation der HIF-NIS-MSCs in ein subkutanes HuH7 Xenograftmausmodell.	76
Abb. 13: Hypoxie-induzierte, NIS-vermittelte ¹²³ I-Aufnahme im Tumor, im Vergleich zu Nichtzielorganen, nach intravenöser Applikation der HIF-NIS-MSCs in ein subkutanes HuH7 Xenograftmausmodell.	76
Abb. 14: Hypoxie-induzierte NIS-Expression im Tumor nach intravenöser Applikation der HIF-NIS-MSCs in ein subkutanes HuH7 Xenograftmausmodell.	77
Abb. 15: Keine Induktion eines therapeutischen Effekts nach HIF-NIS-MSC-vermittelter ¹³¹ I-Aufnahme in den Tumor eines subkutanen HuH7 Xenograftmausmodells.	79
Abb. 16: Keine Reduktion der Tumorzellproliferation oder der Blutgefäßdichte im Tumor, nach HIF-NIS-MSC-vermittelter ¹³¹ I-Aufnahme in den Tumor eines subkutanen HuH7 Xenograftmausmodells.	80
Abb. 17: Makroskopische und mikroskopische Darstellung eines orthotopen HuH7 Tumors.	81
Abb. 18: Hypoxie-induzierte, NIS-vermittelte ¹²⁴ I-Aufnahme im Tumor nach intravenöser Applikation der HIF-NIS-MSCs in ein orthotopes HuH7 Xenograftmausmodell.	82

Abb. 19: Hypoxie-induzierte, NIS-vermittelte ^{123}I -Aufnahme im Tumor, im Vergleich zu Nichtzielorganen, nach intravenöser Applikation der HIF-NIS-MSCs in ein orthotopes HuH7 Xenograftmausmodell.....	83
Abb. 20: Hypoxie-induzierte NIS-Expression im Tumor nach intravenöser Applikation der HIF-NIS-MSCs in ein orthotopes HuH7 Xenograftmausmodell.	84
Abb. 21: Induktion therapeutischer Effekte nach HIF-NIS-MSC-vermittelter ^{131}I -Aufnahme in den Tumor eines orthotopen HuH7 Xenograftmausmodells.....	85
Abb. 22: Geringere Tumorperfusion nach HIF-NIS-MSC-vermittelter ^{131}I -Aufnahme in den Tumor eines orthotopen HuH7 Xenograftmausmodells.	86
Abb. 23: Geringere Tumorzellproliferation und Blutgefäßdichte im Tumor, nach HIF-NIS-MSC-vermittelter ^{131}I -Aufnahme in den Tumor eines orthotopen HuH7 Xenograftmausmodells.	87
Abb. 24: 3-Dimensionale Darstellung des Wachstums des orthotopen HuH7 Tumors.....	89
Abb. 25: 3-Dimensionale Darstellung der Vaskularisierung und MSC-Verteilung im orthotopen HuH7 Tumor.....	90
Abb. 26: Korrelation der MSC-Signale aus der 3D-Lichtblattfluoreszenzmikroskopie mit der NIS-Expression aus der 2-dimensionalen Fluoreszenzmikroskopie.....	91
Abb. 27: T3- bzw. T4-induzierte, Tetrac-abhängige HIF-1 α -Expression.....	92
Abb. 28: T3- bzw. T4-induzierte, Tetrac-abhängige Expression der HIF-1-responsiven Gene <i>STC1</i> , <i>GLUT1</i> , <i>PFKP</i> und <i>MCT4</i>	93
Abb. 29: T3- bzw. T4-induzierte, NIS-vermittelte ^{125}I -Aufnahme in HIF-NIS-MSCs in Gegenwart von 20% cHuH7M.....	94
Abb. 30: T3- bzw. T4-induzierte, NIS-vermittelte ^{125}I -Aufnahme in HIF-NIS-MSCs in Gegenwart von 100% cHuH7M.....	95
Abb. 31: NIS-vermittelte ^{125}I -Aufnahme in HIF-NIS-HuH7 nach CoCl_2 Stimulation.....	96
Abb. 32: Keine T3- bzw. T4-induzierte, NIS-vermittelte ^{125}I -Aufnahme in Integrin $\alpha\beta 3$ -negative HIF-NIS-HuH7.	97
Abb. 33: Inhibition der T3- bzw. T4-induzierten, NIS-vermittelten ^{125}I -Aufnahme in HIF-NIS-MSCs durch Inhibitoren des PI3K und des ERK1/2 Signalwegs.....	98
Abb. 34: Starker Gewichtsverlust und Atemprobleme nach einer Schilddrüsenablation mit einer LID und 18,5 MBq ^{131}I	99

Abb. 35: Reduktion des T4-Gehalts im Mausblut/Mausserum auf ein Level unterhalb des Detektionslimits und Steigerung der TSH β -Expression in der Maushypophyse durch eine Schilddrüsenablation mit einer LID, TSH und 5,5 MBq ^{131}I	100
Abb. 36: Elimination der thyreoidalen Radionuklid Aufnahme nach einer Schilddrüsenablation mit einer LID, TSH und 5,5 MBq ^{131}I	101

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verbrauchsmaterialien	31
Tabelle 2: Plasmide und Vektoren	32
Tabelle 3: Zelllinien und primäre Zellen.....	32
Tabelle 4: Zellkulturmedien	34
Tabelle 5: Zellkulturzusätze.....	34
Tabelle 6: Andere Zellkulturreagenzien	35
Tabelle 7: Bakterien	35
Tabelle 8: Wachstumsmedien für Bakterien.....	35
Tabelle 9: Chemikalien und Reagenzien	36
Tabelle 10: Radionuklide	38
Tabelle 11: Kommerziell erworbene Puffer, Lösungen und Gele	38
Tabelle 12: Selbst hergestellte Puffer und Lösungen.....	40
Tabelle 13: Enzyme	40
Tabelle 14: Elektrophoresestandards	41
Tabelle 15: Primäre Antikörper	41
Tabelle 16: Sekundäre Antikörper.....	42
Tabelle 17: Kits und Zubehör	42
Tabelle 18: <i>Primer</i>	43
Tabelle 19: Mäuse	44
Tabelle 20: Materialien und Reagenzien für Tierversuche	44
Tabelle 21: Geräte	45
Tabelle 22: Sonstiges.....	47
Tabelle 23: Software	47
Tabelle 24: Internetseiten	48
Tabelle 25: cDNA-Synthese	55
Tabelle 26: Probenzusammensetzung für qRT-PCR	56

Tabelle 27: Programm für qRT-PCR.....	57
---------------------------------------	----

Abkürzungsverzeichnis

Einheiten	
µg	Mikrogramm
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
cm	Zentimeter
g	Gramm
h	Stunde
kDa	Kilodalton
M	Molar
MBq	Megabecquerel
MeV	Megaelektronenvolt
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
ng	Nanogramm
nM	Nanomolar
nm	Nanometer
s	Sekunde
U	Einheit (Enzyme)
V	Volt
v/v	Volumen/Volumen
W	Watt
w/v	Gewicht/Volumen
Zeichen	
% ID/g	Prozentualer Anteil der injizierten Radionuklidosis pro Gramm Tumor
A	
A	Absorption
A.u.	Arbitrary unit

AEC	3-Amino-9-ethylcarbazol
AFP	α-Fetoprotein
Arg-Gly-Asp	Arginin, Glycin und Asparaginsäure
B	
BSA	Bovines Serumalbumin
BSD	Blasticidinresistenzgen
C	
CAF	Cancer-associated fibroblast
CCL2	Monocyte chemoattractant protein-1
CCR	CC-Motiv-Chemokinrezeptor
CD	Cluster of differentiation
cDNA	Komplementäre DNS
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CEUS	Kontrastmittel-unterstützter Ultraschall
cHuH7M	konditioniertes HuH7 Medium
ClO ₄ ⁻	Perchlorat
CMV	Cytomegalovirus
CMV Pro	CMV Promoter
CoCl ₂	Cobaltchlorid
CPS	Cadence™ Contrast Pulse Sequencing
csFBS	Hormon-reduziertes FBS
CT	Computertomographie
CXCR	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor
D	
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol

E	
E	Energie
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	EGF-Rezeptor
EPO	Erythropoetin
ERK	Extracellular-signal regulated kinase
EZM	Extrazelluläre Matrix
F	
18F-TFB	18F-Tetrafluoroborat
FBS	Fetales Kälberserum
FGF	Fibroblast growth factor
FIH-1	Factor inhibiting HIF-1
for	Forward
G	
GLUT-1	Glukosetransporter 1
H	
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
HCC	Hepatocellular carcinoma/hepatozelluläres Karzinom
HE	Hämatoxylin-Eosin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HGF	Hepatocyte growth factor
HIF-1	Hypoxie-induzierbarer Faktor 1
HLA-DR	Human Leukocyte Antigen - antigen D Related
HRE	Hypoxie-responsives Element
HRP	Hypoxie-induzierbarer Promoter
HS	Harnstoff-SDS
HSV-TK	Herpes-simplex-Virus Thymidinkinase
I	
I ⁻	Iodidion

IF	Immunfluoreszenz
IFN	Interferon
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
IgG	Immunoglobulin G
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
K	
KClO ₄	Kaliumperchlorat
L	
LB	Lysogeny broth
LUC	Luciferase
M	
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein 1
MG	Molekulargewicht
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MMP	Matrixmetalloproteinase
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
MSC	Mesenchymale Stammzelle
MTT	Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide
N	
n	Anzahl der Tiere
Na ⁺	Natriumionen
NaCl	Natriumchlorid
NaClO ₄	Natriumperchlorat
NaI	Natriumiodid
NaOH	Natronlauge
NIS	Natrium-Iodid-Symporter
NKT-Zellen	Natürliche Killer-T-Zellen
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
O	
OD	Optische Dichte

P	
P/S	Penicillin/Streptomycin
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PBS-T	PBS mit Tween20
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF	Platelet-derived growth factor
PE	Peak enhancement
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PGK1	Phosphoglyceratkinase 1
pH	Potentia hydrogenii
PHD	Propylhydroxylasen
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKC α	Proteinkinase C α
PLC	Phospholipase C
Poly HEMA	Poly(2-hydroxyethylmethacrylat)
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
Q	
qRT-PCR	Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion
R	
RANTES	Regulated And Normal T cell Expressed and Secreted
rev	Reverse
ROI	Region of Interest
RT	Raumtemperatur
S	
S.O.C.	Super Optimal broth with Catabolite repression
SCN-	Thiocyanat
SD	Schilddrüse
SDF-1	Stromal cell-derived factor 1
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler
SPD	Speicheldrüse

SPECT	Einzelphotonen-Emissions-computertomographie
Src	Sarcoma
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
Std	Standard
T	
T3	3,3',5-Triod-L-thyronin
T4	L-Thyroxin
TAF	Tumor-associated fibroblast
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TBS-T	TBS mit Tween20
TE	Tris-EDTA
Tetrac	3,3',5,5'-Tetraiodothyroacetic acid
TGF- β	Transforming growth factor- β
TNF- α	Tumour necrosis factor- α
TR	Schilddrüsenhormonrezeptor
Tris	2-Amino2(hydroxymethyl)propan-1,3-diol
TSH	Thyreotropin
U	
UV	Ultraviolett
V	
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VHL	von-Hippel-Lindau-E3-Ubiquitinligasekomplex
W	
WB	Western Blot
WiAUC	Wash-in area under the curve
WiPI	Wash-in perfusion index
WiR	Wash-in rate
WT	Wildtyp

Zusammenfassung

Mesenchymale Stammzellen (MSCs) stellen aufgrund ihres Tumortropismus hervorragende Tumorstroma-spezifische Gentransfervehikel zum Transport von Reporter- und Therapiegenen dar. Der Natrium-Iodid-Symporter (*NIS*) ist ein vielversprechendes theranostisches Gen, welches eine repetitive, nicht-invasive Darstellung der MSC-Biodistribution und der funktionalen Transgenexpression sowie die Applikation therapeutischer Radionuklide (^{131}I , ^{188}Re , ^{211}At) ermöglicht. Eine bedeutende Herausforderung in der Krebstherapie stellen hypoxische Tumorregionen dar, da die Tumorzellen in diesen Arealen äußerst resistent gegenüber konventioneller Chemo- und Radiotherapie sind. Aus diesem Grund ist die Entwicklung innovativer Therapiestrategien, die speziell gegen hypoxische Tumorzellen gerichtet sind, erstrebenswert.

In diesem Zusammenhang wurde im ersten Teil dieser Studie, nach der stabilen Transfektion von MSCs mit *NIS* unter Kontrolle eines synthetischen Hypoxie-induzierbaren Promoters (HIF-*NIS*-MSCs), das Potenzial einer MSC-vermittelten, Hypoxie-induzierten, *NIS*-basierten ^{131}I -Therapie evaluiert. Durch die Verwendung von *NIS* als Reportergen konnte, nach systemischer MSC-Applikation, durch ^{123}I -Szintigraphie und ^{124}I -/ ^{18}F -TFB-Positronen-Emissions-Tomographie, eine aktive Rekrutierung der HIF-*NIS*-MSCs in das Tumorstroma sowie eine Hypoxie-induzierte *NIS*-Expression in einem subkutanen und einem orthotopen hepatozellulären Karzinom- (HCC-) Xenograftmausmodell gezeigt werden. Diese Ergebnisse wurden *ex vivo* durch eine ^{123}I -Biodistributionsanalyse und Immunhistochemie bestätigt. Durch die Verwendung von *NIS* als Therapiegen konnte nach Applikation von ^{131}I in HIF-*NIS*-MSC-behandelten Mäusen eine Verlangsamung des Tumorwachstums und eine Reduktion der Tumorperfusion in orthotopen HCC-Tumoren erzielt werden. Dies führte zu einem signifikant verlängerten Überleben der Therapiegruppe, im Vergleich zu den Kontrolltieren (HIF-*NIS*-MSC + NaCl und WT-MSC + ^{131}I). Die ^{131}I -Aufnahme in die subkutanen HCC-Tumoren war nicht ausreichend, um einen therapeutischen Effekt zu erzielen. Dies ist vermutlich auf eine geringere MSC-Rekrutierung in das Tumorstroma und einer damit verbundenen geringeren *NIS*-Expression zurückzuführen.

Die tumorale MSC-Rekrutierung ist ein wesentlicher Einflussfaktor auf die MSC-vermittelte, Hypoxie-induzierte, *NIS*-basierte ^{131}I -Therapie. Daher wurde im nächsten Teil dieser Arbeit das Wachstum des orthotopen Tumors, die Tumovaskularisierung und die MSC-Verteilung im Tumorstroma durch 3D-Lichtblattfluoreszenzmikroskopie untersucht. Mit dieser *deep tissue imaging* Methode konnte gezeigt werden, dass sich die MSCs in *Clustern* im Tumorstroma verteilen und überwiegend in hypoxische Tumorregionen rekrutiert werden. Diese Ergebnisse korrelieren mit 2-dimensionalen immunhistochemischen Analysen, ermöglichen jedoch eine detailliertere Darstellung.

Die MSC-vermittelte, Hypoxie-induzierte, NIS-basierte ^{131}I -Therapie ist zudem abhängig vom Level des Hypoxie-induzierbaren Faktor 1 (HIF-1). Auf der Grundlage, dass die Schilddrüsenhormone T3 und T4 über genomische und nicht-genomische Effekte die HIF-1 α -Expression induzieren können, wurde im darauffolgenden Teil dieser Studie der Effekt von T3 und T4 auf das Hypoxie-responsive Netzwerk in MSCs *in vitro* untersucht. Diese Analysen zeigten eine T3- und T4-induzierte Expression von HIF-1 α und HIF-1-responsiven Genen in Gegenwart von konditioniertem HCC-Zellmedium. Die erhöhte HIF-1 α -Expression führte wiederum im ^{125}I -Uptake Assay zu einer erhöhten NIS-basierten Radioiodaufnahme. Diese Effekte wurden in Integrin $\alpha\beta 3$ -negativen HIF-NIS-transfizierten HuH7 Zellen nicht beobachtet und konnten durch den Integrin $\alpha\beta 3$ -spezifischen Inhibitor Tetrac und durch Inhibitoren des PI3K und ERK1/2 Signalwegs gehemmt werden.

Mit dem Ziel, die Effekte der Schilddrüsenhormone T3 und T4 auf das Hypoxie-responsive Netzwerk in MSCs auch *in vivo* analysieren zu können, wurde im letzten Teil dieser Arbeit ein Protokoll zur Generierung eines athyreoten Mausmodells etabliert. Dabei wurde die Schilddrüse, nach vorheriger Stimulation der thyreoidalen NIS-Expression durch iodarmes Futter und Thyreotropin (TSH), mittels Radioiod (5,5 MBq ^{131}I) ablatiert. Dieses athyreote Tiermodell erlaubt den Einsatz von NIS als Reportergen, ohne dass die Reporterfunktion des extrathyreoidalen NIS durch die TSH- und damit vom Schilddrüsenhormonstatus-abhängige endogene NIS-Expression in der Schilddrüse beeinträchtigt wird.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen das große Potenzial einer MSC-vermittelten, Hypoxie-induzierten, NIS-basierten ^{131}I -Therapie als eine neue, innovative Therapiestrategie zur Behandlung extrathyreoidaler Tumoren. Diese Therapiestrategie wird durch die Schilddrüsenhormone T3 und T4, welche das Hypoxie-responsive Netzwerk in MSCs über das Integrin $\alpha\beta 3$ aktivieren, moduliert.

Summary

Due to their tumour tropism, mesenchymal stem cells (MSCs) are excellent tumour stroma-selective delivery vehicles for reporter and therapy genes. The sodium iodide symporter (*NIS*) is a promising theranostic gene that allows repetitive, non-invasive imaging of MSC biodistribution and functional transgene expression as well as the application of therapeutic radionuclides (^{131}I , ^{188}Re , ^{211}At). A major challenge in cancer therapy are hypoxic tumour regions, since tumour cells in these areas are highly resistant to chemo- and radiotherapy. For this reason, the development of novel, innovative therapy strategies, which specifically target hypoxic tumour cells, is desirable.

In this context, the first part of this study comprises the evaluation of the general potential of using a MSC-mediated, hypoxia-induced, *NIS*-based ^{131}I therapy after stable transfection of MSCs with *NIS* driven by a synthetic hypoxia-responsive promoter (HIF-*NIS*-MSCs). Using *NIS* as reporter gene, active recruitment of the HIF-*NIS*-MSCs into the tumour microenvironment of a subcutaneous and an orthotopic hepatocellular carcinoma (HCC) xenograft mouse model and hypoxia-induced *NIS* expression was demonstrated using ^{123}I -scintigraphy and ^{124}I -/ ^{18}F -TFB-positron emission tomography after systemic MSC application. These results were confirmed by *ex vivo* ^{123}I -biodistribution and immunohistochemical analyses. Using *NIS* as therapy gene, application of ^{131}I resulted in delay of tumour growth and reduction of tumour perfusion in HIF-*NIS*-MSC-treated mice bearing orthotopic HCC tumours. This led to significantly prolonged survival of therapy compared to control mice (HIF-*NIS*-MSC + NaCl and WT-MSC + ^{131}I). Interestingly, radioiodide uptake into subcutaneous tumours was not sufficient to induce therapeutic effects, presumably due to lower tumoural MSC recruitment and consequently lower *NIS* expression.

Tumoural MSC recruitment strongly influences MSC-mediated, hypoxia-induced, *NIS*-based ^{131}I therapy. Therefore, in the next part of this work, tumour growth, vascularisation and MSC distribution within the tumour microenvironment were analysed by light-sheet fluorescence microscopy in orthotopic HCC tumours. Using this deep tissue imaging method, MSCs were shown to be spread across the tumour stroma in clusters and predominantly located in hypoxic regions. These results correlate well with 2-dimensional immunohistochemical analyses, while allowing for greater detail.

MSC-mediated, hypoxia-induced, *NIS*-based ^{131}I therapy is further dependent on the level of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1). On the basis that thyroid hormones T3 and T4 induce HIF-1 α expression through genomic and non-genomic mechanisms, the effect of T3 and T4 on the hypoxia response network in MSCs was evaluated *in vitro* in the next part of this study. These analyses showed a T3- and T4-induced expression of HIF-1 α and HIF-1-responsive genes in the presence of HCC cell-conditioned medium. The increased HIF-1 α expression in turn led to increased *NIS*-based

radioiodide uptake in an ^{125}I -uptake assay. These effects were not observed in integrin $\alpha\text{v}\beta 3$ -negative, HIF-NIS-transfected HCC cells and were reduced upon treatment with the integrin $\alpha\text{v}\beta 3$ -specific inhibitor tetrac and inhibitors of the PI3K and ERK1/2 pathways.

With the objective to analyse the effects of the thyroid hormones T3 and T4 on the hypoxia response network in MSCs *in vivo*, in the next part of this study a protocol for a thyroid-ablated mouse model was established. In this setting, the thyroid was completely destroyed by stimulating thyroidal NIS expression with a low-iodine diet and thyroid-stimulating hormone (TSH) before applying radioiodide (5.5 MBq ^{131}I). This thyroid-ablated mouse model allows the use of *NIS* as reporter gene without interference of the extrathyroidal *NIS* reporter gene with the TSH- and therefore thyroid hormone status-dependent endogenous expression of NIS in the thyroid gland.

The results of this work demonstrate the great potential of a MSC-mediated, hypoxia-induced, NIS-based ^{131}I therapy as a novel, innovative therapy strategy for non-thyroidal tumours. This cancer therapy strategy is influenced by thyroid hormones T3 and T4 activating the hypoxia-response network in MSCs via integrin $\alpha\text{v}\beta 3$.

1 Einleitung

1.1 Krebs und das hepatozelluläre Karzinom

Krebs zählt zu einer der häufigsten Todesursachen weltweit. Im Jahr 2012 wurden 14 Millionen neue Krebserkrankungen diagnostiziert und 8,2 Millionen Menschen sind an den Folgen ihrer Krebserkrankung gestorben (Stewart & Wild, 2014). Unter allen krebsbedingten Todesfällen ist Leberkrebs die dritthäufigste Todesursache (G. L. Davis *et al.*, 2008). Zu den Hauptrisikofaktoren für Leberkrebs zählen eine chronische Infektion mit dem Hepatitis-B- oder Hepatitis-C-Virus, regelmäßiger Alkoholkonsum und eine Kontamination von Lebensmitteln mit Aflatoxin B1 (RKI, 2016). Die häufigste Form von Leberkrebs ist das hepatozelluläre Karzinom. Die einzigen kurativen Behandlungsmöglichkeiten für diese Tumorerkrankung sind die chirurgische Resektion, die Lebertransplantation und die perkutane Ablation (Bruix *et al.*, 2006; Mazzaferro *et al.*, 2008). Da das hepatozelluläre Karzinom aber häufig erst in späten Stadien diagnostiziert wird, kann eine chirurgische Resektion zu einer nicht ausreichenden Leberfunktion führen und die perkutane Ablation ist in solchen Fällen mit einem hohen Risiko einer nicht vollständigen Tumorelimination assoziiert (Bruix *et al.*, 2006; Mazzaferro *et al.*, 2008). Eine Lebertransplantation ist häufig die Methode der Wahl, aber aufgrund der strengen Selektionskriterien, der hohen Kosten und der geringen Anzahl an Spenderorganen nur in ausgewählten Fällen durchführbar (Mazzaferro *et al.*, 2008). Dies zeigt die dringende Notwendigkeit der Entwicklung neuer Strategien zur Therapie dieser Tumorerkrankung. Eine wesentliche Voraussetzung hierfür ist eine detaillierte Kenntnis der Tumorbilogie.

1.2 Tumorbilogie

1.2.1 Aufbau des Tumorstromas

Der Begriff „Tumor“ stammt aus dem Lateinischen und bedeutet „Schwellung“ oder „Geschwulst“ (Sedlacek, 2013). Hierbei handelt es sich um die Zunahme des Volumens eines Gewebes. Tumoren können gutartig (benigne) oder bösartig (maligne) sein. Gutartige Tumoren wachsen langsam und lokal expansiv, wohingegen bösartige Tumoren oft sehr schnell, lokal infiltrierend und destruierend wachsen (Sedlacek, 2013). Je nach Differenzierungsgrad kommt es zu einer Gefäßinvasion und zur Bildung von Metastasen (Sedlacek, 2013).

Ein Tumor besteht aus den Tumorzellen, welche von einem „gutartigen“ Tumorstroma umgeben sind. Das Tumorstroma wird aus einer extrazellulären Matrix (EZM) und verschiedensten zellulären Bestandteilen, wie Endothelzellen, Fibroblasten, Perizyten, Neutrophile, B- und T-Lymphozyten, natürliche Killerzellen (NK-Zellen), natürliche Killer-T-Zellen (NKT-Zellen), Makrophagen und

dendritischen Zellen gebildet (Hanahan & Weinberg, 2000, 2011). Jeder dieser Bestandteile steht mit anderen über lösliche Faktoren, wie Chemokine, Zytokine, Wachstumsfaktoren, inflammatorische Faktoren und Enzyme, oder über Zell-Zell-Kontakte in Verbindung und hat eine spezialisierte Funktion, welche die Tumoruminitiation, das Tumorstromawachstum bzw. die Tumorstromaprogression beeinflusst (Li, Fan & Houghton, 2007). Den größten zellulären Anteil im Tumorstroma bilden die Fibroblasten. Diese werden als *tumor-associated fibroblasts* (TAFs) oder *cancer-associated fibroblasts* (CAFs) bezeichnet und unterscheiden sich sowohl funktional als auch phänotypisch von Fibroblasten in normalen Geweben (Kalluri & Zeisberg, 2006; Ostman & Augsten, 2009). Sie werden aus verschiedenen Vorläuferzellen gebildet, wie z.B. aus Endothelzellen, Myoepithelzellen, glatten Muskelzellen oder mesenchymalen Stammzellen (MSCs) (Balkwill, Capasso & Hagemann, 2012). CAFs übernehmen innerhalb des Tumorstromas verschiedene Funktionen. Zum einen sezernieren sie verschiedene Wachstumsfaktoren, wie z.B. den *hepatocyte growth factor* (HGF), den *fibroblast growth factor* (FGF) und den *insulin-like growth factor 1* (IGF-1), welche alle eine mitogene Wirkung auf die Tumorzellen haben (Balkwill *et al.*, 2012). Sie beeinflussen aber auch die epithelial-mesenchymale Transition der Tumorzellen durch die Sekretion des *transforming growth factor β* (TGF- β) oder sie verstärken das Wachstum der Tumorzellen, verlängern deren Überleben oder induzieren die Rekrutierung weiterer Stromazellen durch die Sekretion des *stromal cell-derived factor 1* (SDF-1) (Erez, Truitt, Olson, Arron & Hanahan, 2010; Orimo *et al.*, 2005). Letztlich beeinflussen sie auch die EZM, indem sie sowohl deren Bestandteile exprimieren können, wie z.B. Kollagen A, als auch Enzyme sezernieren, welche diese umstrukturieren, wie z.B. verschiedene Matrixmetalloproteinasen (MMPs) (Erez *et al.*, 2010). Eine weitere Zellpopulation im Tumorstroma sind die Perizyten. Diese bilden eine strukturelle Stütze für die Tumorblutgefäße (Armulik, Genove & Betsholtz, 2011). In einer Studie von Cooke *et al.* konnte gezeigt werden, dass eine geringe Anzahl an Perizyten zu einem erhöhten Hypoxiegehalt und einer verstärkten Metastasierung führt, was mit einer schlechten Prognose für Patienten einhergeht (Cooke *et al.*, 2012). Die Tumorblutgefäße werden von den Endothelzellen gebildet. Durch die Expression eines angiogenetischen Signals, wie z.B. der *vascular endothelial growth factor* (VEGF), der FGF oder der *platelet-derived growth factor* (PDGF), durch die Tumorzellen oder die inflammatorischen Zellen, wird die Angiogenese stimuliert (Balkwill *et al.*, 2012). Durch die Blutgefäße werden die Tumorzellen mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt und Stoffwechselprodukte werden abtransportiert. Allerdings sind diese neugebildeten Blutgefäße heterogen mit chaotischen Verzweigungen, einem unebenen Lumen und einer erhöhten Durchlässigkeit für verschiedene Moleküle (Balkwill *et al.*, 2012). Durch diese erhöhte Durchlässigkeit steigt nicht nur der interstitielle Flüssigkeitsdruck, sondern die Tumorzellen werden zudem nicht ausreichend mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt, wodurch diese hypoxisch

werden und zu metastasieren beginnen (Balkwill *et al.*, 2012). Endothelzellen sind auch ein Bestandteil der lymphatischen Gefäße. Diese ermöglichen eine Verteilung der Tumorzellen im Körper und unterstützen damit die Metastasierung (Swartz & Lund, 2012). Sie können aber auch die Immunantwort des Patienten modellieren oder das Tumorstroma mechanisch umstrukturieren (Swartz & Lund, 2012). Eine weitere wichtige Rolle spielen die Immunzellen, zu welchen u.a. die B- und T-Lymphozyten, die NK- und NKT-Zellen, die Neutrophilen, die Makrophagen und die dendritischen Zellen gehören. Für die Immunzellen wurden sowohl positive als auch negative Effekte auf die Tumorprogression beobachtet, abhängig von der Immunzellklasse, der Tumorart und dem Grad der Tumorerkrankung (Balkwill *et al.*, 2012). So gibt es z.B. unter den T-Lymphozyten die CD8⁺ T-Gedächtniszellen, welche Tumorzellen zerstören können und deshalb mit einer guten Prognose für den Patienten assoziiert sind (Fridman, Pages, Sautes-Fridman & Galon, 2012). Dem gegenüber stehen die TH17 Zellen, die durch ihre Expression von Interleukin (IL)-17A, IL-17F, IL-21 und IL-22 das Tumorstromawachstum fördern und dadurch zu einer schlechten Prognose für den Patienten führen (Fridman *et al.*, 2012). Einige Tumoren beherbergen auch Adipozyten in ihrem Stroma. Diese können über die Sekretion von Adipokinen Tumorzellen rekrutieren und mit Hilfe von gespeicherten Fettsäuren ernähren (Nieman *et al.*, 2011). Diese zellulären Bestandteile, die EZM und die löslichen Faktoren innerhalb des Tumorstromas schaffen ein aktives Milieu für ein effektives Tumorstromawachstum (Abb. 1).



Abb. 1: Schematische Darstellung des Tumorstromas. Das Tumorstroma wird aus verschiedensten zellulären Bestandteilen und einer EZM gebildet, welche gemeinsam das Tumorwachstum und die Tumorprogression beeinflussen [in Anlehnung an (Balkwill *et al.*, 2012)].

1.2.2 Schlüsselmerkmale von Krebs

Die Veränderungen in der Physiologie der einzelnen zellulären Komponenten, welche durch dieses aktive Tumormilieu entstehen, wurden von Hanahan und Weinberg im Jahr 2000 zusammengefasst und als Schlüsselmerkmale von Krebs (*Hallmarks of Cancer*) bezeichnet (Hanahan & Weinberg, 2000):

- (1) Selbstversorgung mit wachstumsstimulierenden Signalen
- (2) Unempfindlichkeit gegenüber wachstumshemmenden Signalen
- (3) Entkommen des programmierten Zelltods
- (4) Invasion in fremdes Gewebe und Metastasierung
- (5) Anhaltende Angiogenese
- (6) Grenzenloses Potenzial zur Replikation bzw. zur Zellteilung

Diese Eigenschaften wurden im Jahr 2011 durch Hanahan und Weinberg ergänzt (Hanahan & Weinberg, 2011). Hierbei definierten sie folgende Kriterien als eigenständige Merkmale, die zu einer feineren Differenzierung der Charakteristika 1-3 führen:

- (7) Genomische Instabilität, welche zu einer Anhäufung von Mutationen führt
- (8) Der Beitrag von entzündlichen Prozessen auf die Tumorprogression

Es wurden aber auch grundlegend neue Charakteristika definiert:

- (9) Umprogrammierung des Energiehaushaltes
- (10) Umgehung des Immunsystems

Diese bisher gewonnenen Erkenntnisse bieten einen kleinen Einblick in die Komplexität der Tumorbilogie und tragen dadurch wesentlich zur Entwicklung neuer, innovativer Therapiestrategien bei.

1.3 Tumorphoxie

1.3.1 Hypoxieantwort der Zelle

Bereits im Jahr 1955 konnte von Thomlinson und Gray gezeigt werden, dass Tumoren, im Vergleich zum physiologischen Zustand, Regionen mit reduziertem Sauerstoffgehalt aufweisen (Thomlinson & Gray, 1955). Diese hypoxischen Regionen resultieren aus einem Ungleichgewicht zwischen Sauerstoffbereitstellung und Sauerstoffverbrauch der Zellen. Das Sauerstoffdefizit wiederum entsteht durch die, im Vergleich zu normalen Blutgefäßen, strukturell und funktional unterschiedlichen Blutgefäße des Tumors, durch die steigende Distanz der Zellen zu den Blutgefäßen, aufgrund der stark proliferierenden Tumormasse, und durch die reduzierte Fähigkeit des Blutes, Sauerstoff zu transportieren (Vaupel & Harrison, 2004). Der Hypoxie-induzierbare Faktor 1 (HIF-1) ist der Hauptmediator der Zellantwort auf Hypoxie. Neben HIF-1 gibt es noch zwei weitere Isoformen, HIF-2 und HIF-3, welche aber nicht in jedem Gewebe exprimiert werden und, im Gegensatz zu HIF-1, weitaus weniger erforscht sind (Burrows, Babur, Resch, Williams & Brabant, 2011). HIF-1 besteht aus der Sauerstoff-abhängig regulierten α -Untereinheit und der konstitutiv exprimierten β -Untereinheit (auch bekannt als *aryl hydrocarbon nuclear receptor translocator*) (Kewley, Whitelaw & Chapman-Smith, 2004; Wang, Jiang, Rue & Semenza, 1995). Beide Untereinheiten gehören zu der Familie der *basic helix-loop-helix Per-Arnt-Sim* Transkriptionsfaktoren (Kewley *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 1995). Unter physiologischem Sauerstoffgehalt wird die α -Untereinheit direkt nach der Translation abgebaut, sodass es zu keiner Bildung des HIF-1 Komplexes kommen kann. Hierfür werden die Prolinreste 402 und 564 innerhalb der Sauerstoff-abhängigen Degradierungsdomäne, durch die Propylhydroxylasen (PHD) 1-3, hydroxyliert (W. G. Kaelin, 2005; Srinivas, Zhang, Zhu & Caro, 1999). Diese Hydroxylierung führt zu einer Bindung des von-Hippel-Lindau-E3-Ubiquitinligasekomplexes (VHL), durch welchen die α -Untereinheit ubiquitiniert wird, sodass diese durch das Proteasom abgebaut werden kann (Masson

& Ratcliffe, 2003; Masson, Willam, Maxwell, Pugh & Ratcliffe, 2001; McNeill *et al.*, 2002). Die Hydroxylierung des Asparaginrestes 803 in der C-terminalen Transaktivierungsdomäne (C-TAD), durch den *factor inhibiting HIF-1* (FIH-1), findet auch unter physiologischem Sauerstoffgehalt statt und verhindert die Rekrutierung des Co-Aktivators *CREB-binding protein/E1A binding protein p300* (Hewitson *et al.*, 2002; Lando, Peet, Whelan, Gorman & Whitelaw, 2002). Unter Hypoxie ist der Gehalt an Sauerstoff limitiert, wodurch die α -Untereinheit nicht hydroxyliert werden kann und somit auch nicht abgebaut wird (W. G. Kaelin, Jr. & Ratcliffe, 2008; Schofield & Zhang, 1999). Die α -Untereinheit akkumuliert im Zytoplasma und wandert in den Nukleus, wo sie mit der β -Untereinheit fusioniert (Zimna & Kurpisz, 2015). Das Heterodimer kann nun an die Hypoxie-responsiven Elemente in der Promoterregion von O_2 -regulierten Genen binden und deren Expression induzieren (Jiang, Zheng, Leung, Roe & Semenza, 1997; Pugh, O'Rourke, Nagao, Gleadle & Ratcliffe, 1997) (Abb. 2). Eine weitere Möglichkeit HIF-1 α zu stabilisieren ist die Inaktivierung der PHDs durch reaktive Sauerstoffspezies aus den Mitochondrien (Pouyssegur & Mechta-Grigoriou, 2006) oder durch Cobaltchlorid ($CoCl_2$) (Yuan, Hilliard, Ferguson & Millhorn, 2003). Die Anzahl der Hypoxie-responsiven Gene beläuft sich auf über 800 (Schodel *et al.*, 2011; Xia *et al.*, 2009), u.a. verteilt auf verschiedene Aspekte der Krebsbiologie, wie die Angiogenese (z.B. *VEGF*), die Zellproliferation und das Zellüberleben (z.B. *CDKN1A* und *CDKN1B*), der Zellmetabolismus (z.B. *GLUT1*), die epithelial-mesenchymale Transition, die Invasion und die Metastasierung (z.B. *MMP1* und *MMP9*) (Semenza, 2012).

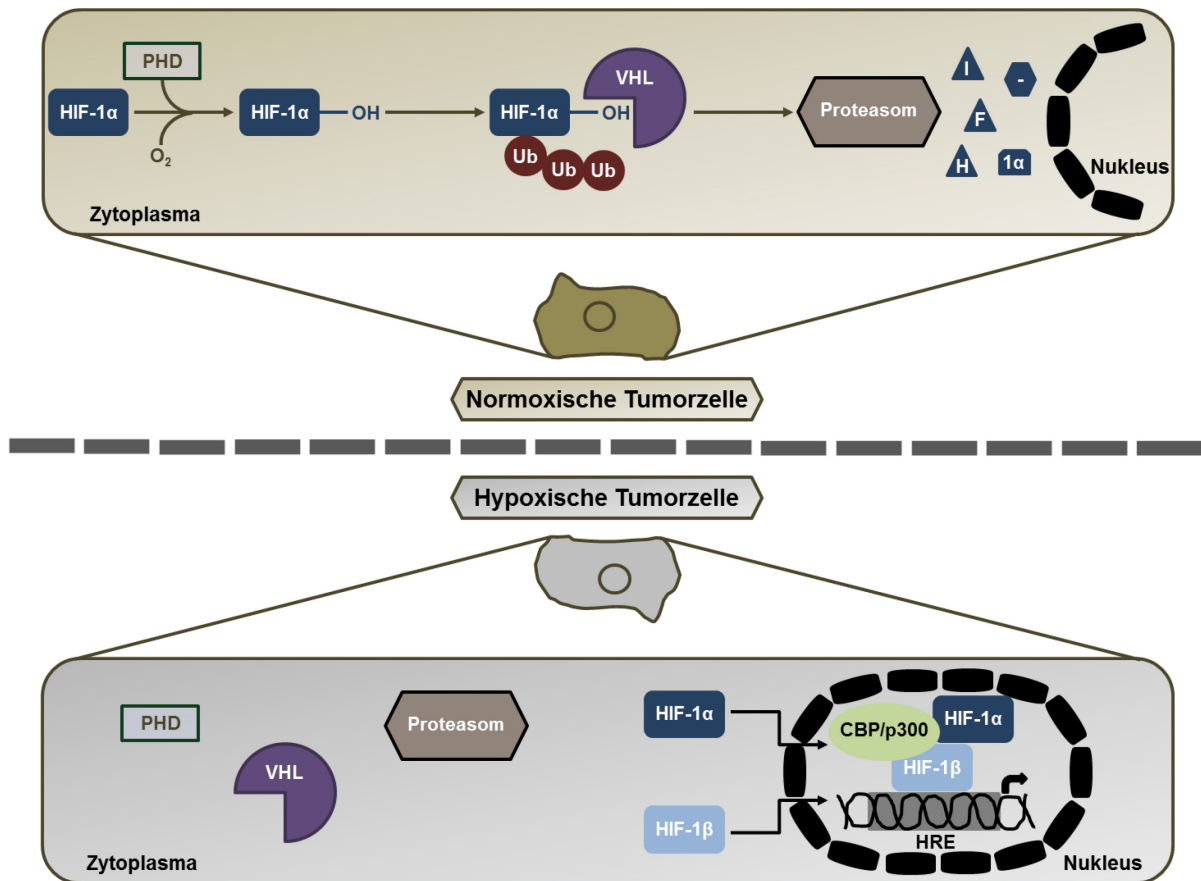


Abb. 2: Schematische Darstellung der Regulation von HIF-1α. Unter Normoxie wird HIF-1α durch PHDs hydroxyliert, durch den VHL ubiquitiniert und durch das Proteasom abgebaut. Unter Hypoxie wandert die α-Untereinheit in den Nukleus, fusioniert mit der β-Untereinheit und induziert die Expression Hypoxie-responsiver Gene [in Anlehnung an (Shimoda, 2012)].

1.3.2 Therapie hypoxischer Tumorzellen

In den letzten Jahren hat sich immer deutlicher herauskristallisiert, dass Patienten, deren Tumoren oder Metastasen einen hohen Grad an Hypoxie aufweisen, eine aggressivere Krebserkrankung aufzeigen, welche mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist (Brizel *et al.*, 1996; Brizel, Sibley, Prosnitz, Scher & Dewhirst, 1997; Hockel *et al.*, 1993; Nordmark, Overgaard & Overgaard, 1996; Sundfor, Lyng & Rofstad, 1998). Der hohe Grad an Aggressivität ist u.a. auf die Resistenz hypoxischer Tumorzellen gegenüber konventionellen Therapiemethoden, wie z.B. Chemo- oder Radiotherapie, zurückzuführen (Hockel & Vaupel, 2001; Y. Kim, Lin, Glazer & Yun, 2009). Diese Resistenz kommt durch drei verschiedenen Aspekte zustande (Kizaka-Kondoh, Tanaka, Harada & Hiraoka, 2009): (I) Die hypoxischen Tumorareale werden vermindert durchblutet, sodass der Transport des Therapeutikums zum Tumor erschwert und keine wirksame Dosis erreicht wird. (II) Einige Krebsmedikamente sind auf proliferierende Zellen ausgerichtet und viele Tumorzellen in hypoxischen Regionen teilen sich nur noch sehr wenig bzw. gar nicht mehr. (III) Einige Krebsmedikamente können ihre vollständige Wirkung nicht entfalten, da hierfür

Sauerstoffmoleküle benötigt werden, wie es z.B. bei der Bestrahlung der Fall ist. Das schlechtere Therapieansprechen der Patienten mit hypoxischen Tumoren ist, im Vergleich zu Patienten mit weniger hypoxischen Tumoren, mit einem häufigeren Wiederauftreten der Erkrankung und einer geringen Überlebensdauer assoziiert (Brizel *et al.*, 1996; Brizel *et al.*, 1997; Hockel *et al.*, 1993; Nordsmark *et al.*, 1996; Sundfor *et al.*, 1998). Um dieser Problematik entgegenzuwirken, wurden Strategien entwickelt, welche gezielt gegen diese hypoxischen Tumorzellen gerichtet sind, wie z.B. die Hypoxie-basierte Gentherapie. Bei dieser wird die Expression des Therapiegens durch einen Hypoxie-responsiven Promoter (HRP) gesteuert. Dieser besteht aus Hypoxie-responsiven Elementen, welche von verschiedenen Hypoxie-responsiven Genen stammen können, wie z.B. das Phosphoglyceratkinase 1- (*PGK1*), Erythropoetin- (*EPO*) oder *VEGF*-Gen und einem basalen Promoter (Rhim, Lee & Lee, 2013). Die Hypoxie-basierte Gentherapie ist aufgrund ihrer hohen regionalen und temporalen Spezifität besonders effektiv und mit einer geringen Anzahl an unerwünschten Nebenwirkungen verbunden (H. A. Kim, Mahato & Lee, 2009). Die regionale Spezifität ist dadurch gegeben, dass die Expression des Gens, welches durch einen HRP kontrolliert wird, nur in hypoxischen Arealen induziert wird (Rhim *et al.*, 2013). Die temporale Spezifität wird dadurch gewährleistet, dass nach der Wiederherstellung eines normoxischen Zustands die Genexpression wieder eingestellt wird, wodurch unspezifische und unerwünschte Nebenwirkungen minimiert werden können (Rhim *et al.*, 2013). Aufgrund dieser vielversprechenden Eigenschaften ist die Hypoxie-basierte Gentherapie immer weiter in den Fokus der Forschung gerückt (Harada, 2011).

1.4 Gentherapie

Unter dem Begriff „Gentherapie“ versteht man Strategien, durch welche die Expression eines Gens modifiziert werden kann oder die Korrektur eines fehlerhaften Gens erreicht wird (ASGCT, 2016). Die ersten Experimente zum Gentransfer in Säugerzellen wurden im Jahr 1962 von Szybalski und Szybalska durchgeführt (Szybalska & Szybalski, 1962). Sie konnten zeigen, dass eine Inosinmonophosphat-Pyrophosphorylase negative Zelllinie (D98/AH-2), welche mit der DNA einer Inosinmonophosphat-Pyrophosphorylase positiven Zelllinie (D98/AG) transfiziert wurde, danach auch diese DNA aufwies (Szybalska & Szybalski, 1962). Seit dieser Zeit hat sich die Technik stetig weiterentwickelt. Der Fokus der Gentherapie liegt nun nicht mehr nur auf der Therapie von vererbten Gendefekten, wie z.B. bei der zystischen Fibrose oder Hämophilie, durch das Ersetzen des fehlerhaften Gens, sondern auch auf der Bekämpfung von Krankheiten, die im Laufe des Lebens erlangt werden, wie z.B. Krebs (Conrad *et al.*, 2007). Für die Krebstherapie ist ein Gentransfersystem wünschenswert, welches systemisch appliziert werden kann, bei ausreichend hoher Transduktionseffizienz und Tumorselektivität sowie möglichst geringer systemischer Toxizität, um

so, neben dem Primärtumor, auch Metastasen gezielt erreichen zu können. Bisher wurde die Effektivität verschiedenster viraler und nicht-viraler Gentransfersysteme evaluiert, welche beide wesentliche Vor- und Nachteile aufweisen. Ein großer Vorteil des viralen Gentransfers ist die hohe Transduktionseffizienz, wodurch diese Methode besonders attraktiv ist (Gabriel, Schmidt & von Kalle, 2012; Raper *et al.*, 2003). Nachteile dieser Methode sind, dass die Viren vom Immunsystem des Patienten erkannt und attackiert werden können, es zu einer ineffizienten Virusverteilung im Tumor und, abhängig von der Virusart, zu einer insertionellen Mutagenese und Virusakkumulation in der Leber kommen kann (Gabriel *et al.*, 2012; Raper *et al.*, 2003). Bei den viralen Gentransfersystemen unterscheidet man zwischen Vektoren, die sich in das humane Genom integrieren, wie z.B. retrovirale, lentivirale und adeno-assoziierte virale Vektoren und solchen, die sich, ohne Integration in das humane Genom, im Nukleus befinden, wie z.B. adenovirale Vektoren (Mali, 2013). Diese Viren transduzieren ihre Wirtszellen und schleusen ihr genetisches Material im Zuge ihres Replikationszyklus in die Zelle ein (Mali, 2013). Innovative, nicht-virale Gentransfersysteme zeigen eine geringe Immunogenität, eine hohe Biokompatibilität, ein geringes Mutationsrisiko, sind relativ einfach zu synthetisieren und handzuhaben (Schaffert & Wagner, 2008; Wolff & Rozema, 2008). Zu diesen gehören die kationischen Polymere und die kationischen Lipide, welche mit der negativ geladenen DNA Polyplexe, Lipoplexe oder Lipopolyplexe bilden (Collet, Grillon, Nadim & Kieda, 2013). Eine weitere Klasse der nicht-viralen Gentransfersysteme bilden die Liposomen, welche die DNA in ihre Phospholipidschicht einschließen, sodass diese vor enzymatischem Abbau und einer Destabilisierung durch elektrostatische Interaktionen mit Serumproteinen im Blut geschützt ist (Felgner *et al.*, 1997). Die positive Ladung dieser Gentransfersysteme ermöglicht zudem eine enge Interaktion mit der negativ geladenen Zellmembran, wodurch die Aufnahme in die Zelle beschleunigt wird (Collet *et al.*, 2013). Eine weitere Klasse der nicht-viralen Gentransfersysteme sind die Exosomen. Hierbei handelt es sich um ein natürliches, von einer Zelle produziertes, Liposom, welches die DNA, wie synthetische Liposomen, in ihre Phospholipidschicht einschließt und einen spezifischen Transfer von Molekülen zwischen Zellen ermöglicht (Collet *et al.*, 2013). Die Oberfläche dieser viralen und nicht-viralen Gentransfersysteme kann durch die Anlagerung eines Tumor-spezifischen Liganden so modifiziert werden, dass die Tumorspezifität erhöht wird. In den letzten Jahren hat sich in dem Bereich der nicht-viralen Gentransfersysteme mit den MSCs noch eine weitere Klasse etabliert. Diese weisen verschiedene Eigenschaften auf, welche sie zu vielversprechenden, nicht-viralen Gentransfersystemen werden lassen. Sie sind einfach zu isolieren, zu charakterisieren, *in vitro* zu expandieren, können auf einfache Weise mit einem breiten Spektrum an Vektoren genetisch modifiziert werden, sind genetisch stabil, können das transfizierte Gen als sekretorisches Protein exprimieren und haben einen Tropismus für Tumoren und deren Metastasen (Dwyer, Khan, Barry,

O'Brien & Kerin, 2010; Hagenhoff *et al.*, 2016). MSCs können auch als Transfervehikel für den Transport von Viren zu Tumoren und deren Metastasen genutzt werden. Die Viren werden dann im Tumor freigesetzt und können die umliegenden Tumorzellen transduzieren (Collet *et al.*, 2013).

1.5 MSCs

MSCs sind multipotente, nicht-hämatopoetische Zellen, welche vorwiegend aus dem Knochenmark, aber auch aus einer Vielzahl anderer Gewebe, wie der Nabelschnur oder dem Fettgewebe, isoliert werden können (Bieback, Kern, Kocaomer, Ferlik & Bugert, 2008; Digirolamo *et al.*, 1999). Bisher konnte kein universeller Marker zur Identifikation der MSCs gefunden werden. Aufgrund dessen hat die *“International Society for Cellular Therapy”* drei Kriterien zur deren Identifikation definiert (Dominici *et al.*, 2006): (I) MSCs wachsen adhärent an Plastik unter Standardzellkulturbedingungen. (II) MSCs exprimieren *Cluster of differentiation* (CD)105, CD73 und CD90 und zeigen keine Expression von CD45, CD34, CD14 oder CD11b, CD79α oder CD19 und *Human Leukocyte Antigen - antigen D Related* (HLA-DR) Oberflächenmoleküle; (III) MSCs müssen zu Chondroblasten, Adipozyten und Osteoblasten differenzieren können.

MSCs haben die Fähigkeit, sich selbst zu erneuern und in eine Vielzahl von Zellen des Bindegewebes, wie z.B. Adipozyten, Osteozyten, Chondrozyten, Muskelzellen und Stromazellen, zu differenzieren (Barry & Murphy, 2004). Sie spielen dadurch eine essenzielle Rolle bei der Aufrechterhaltung und Wiederherstellung der Gewebeintegrität im Rahmen des normalen Zellaustausches und der Wundheilung (Barry & Murphy, 2004). So werden sie im Falle einer Gewebsverletzung oder chronischen Entzündung in hohem Maße zu diesen Stellen rekrutiert, um aktiv am Wundheilungsprozess mitzuwirken. Dies tun sie, indem sie sich zu den zellulären Komponenten des entsprechenden Gewebes differenzieren, die Blutgefäßversorgung und den Lymphabfluss verbessern und Zytokine und Wachstumsfaktoren sezernieren, welche den Wundheilungsprozess stimulieren (Conrad *et al.*, 2009; Hall *et al.*, 2007; Sasaki *et al.*, 2008). Da Tumoren aufgrund ihrer Gemeinsamkeiten mit chronischen Entzündungen als „Wunde, welche niemals heilt“ bezeichnet werden, migrieren MSCs auch zu primären Tumoren und deren Metastasen (Dvorak, 1986). Nach Integration der MSCs in das Tumorstroma bilden sie das fibrovaskuläre Netzwerk, indem sie zu CAFs/Perizyten differenzieren (Hata *et al.*, 2010; Kidd *et al.*, 2009; E. L. Spaeth *et al.*, 2009). Dieser Tumortropismus bildet die Grundlage für einen Gentherapieansatz, in welchem die MSCs, wie ein Trojanisches Pferd, mit dem therapeutischen Gen transduziert werden, um dieses in das Tumorstroma zu transportieren (Conrad *et al.*, 2007; Dwyer & Kerin, 2010).

Der genaue Prozess der MSC-Rekrutierung in das Tumorstroma ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Es wird vermutet, dass die Mobilisation der MSCs ähnlich wie die Migration von Leukozyten abläuft,

da die entsprechenden Rezeptoren, Integrine und Adhäsionsmoleküle auf der Oberfläche von MSCs exprimiert werden (Chamberlain, Fox, Ashton & Middleton, 2007). Zu den Rezeptoren zählen unter anderem CXCR4, CCR1, CCR4, CCR7, CCR10, CCR9, CXCR5 und CXCR6 (Sohni & Verfaillie, 2013). Die Migration ist in folgende Schritte gegliedert: die Annäherung an das Blutgefäß, das Rollen entlang des Blutgefäßes, das Binden an das Blutgefäß, das intravaskuläre Kriechen und die parazelluläre oder transzelluläre Migration in das Gewebe (Dwyer *et al.*, 2010). Vermittelt wird dieser Migrationsprozess durch eine hohe Konzentration an inflammatorischen Chemokinen und Wachstumsfaktoren. Dazu zählen der *epidermal growth factor* (EGF), VEGF-A, FGF, PDGF, SDF-1 α , IL-8, IL-6, *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*, *granulocyte colony-stimulating factor*, Angiopoetin-1, *monocyte chemoattractant protein 1* (MCP-1), *haematopoietic growth factor*, TGF- β und *urokinase-type plasminogen activator* (Dwyer *et al.*, 2007; Feng & Chen, 2009; Nakamizo *et al.*, 2005; Nakamura *et al.*, 2004; Studeny *et al.*, 2004; Wels, Kaplan, Rafii & Lyden, 2008). Die Anzahl der zum Tumor migrierenden MSCs ist abhängig von der Zusammensetzung des Tumorstromas und dem Ausmaß der Inflammation im Tumor (Kidd *et al.*, 2010; Zielske, Livant & Lawrence, 2009). Die Tumorgroße scheint keinen Einfluss auf diesen Prozess zu haben (Kidd *et al.*, 2010; Zielske *et al.*, 2009). Die Rekrutierung der MSCs in das Tumorstroma konnte schon für eine Vielzahl von Tumormodellen bestätigt werden. Dazu zählen das Mammakarzinom (Usha, Rao, Christopherson li & Xu, 2013), das Kolonkarzinom (Shinagawa *et al.*, 2010), das Melanom (Ren *et al.*, 2008), das Lungenkarzinom (Mohr *et al.*, 2008), das Ovarialkarzinom (Komarova, Kawakami, Stoff-Khalili, Curiel & Pereboeva, 2006), das Glioblastom (Nakamizo *et al.*, 2005), das hepatozelluläre Karzinom (Niess *et al.*, 2011), das Pankreaskarzinom (Zischek *et al.*, 2009) und das Osteosarkom (NguyenThai *et al.*, 2015).

Neben dem Tumortropismus weisen die MSCs noch eine Vielzahl anderer Eigenschaften auf, welche sie zu idealen Gentransfervehikeln werden lassen. Wie bereits im vorherigen Kapitel beschrieben, sind diese einfach zu isolieren und *in vitro* zu expandieren, können einfach mit einem breiten Spektrum an Vektoren genetisch modifiziert werden, sind genetisch stabil und können exprimierte Proteine sezernieren (Dwyer *et al.*, 2010; E. Spaeth, Klopp, Dembinski, Andreeff & Marini, 2008). Nach einer genetischen Manipulation muss allerdings sichergestellt werden, dass die MSCs ihre fundamentalen Charakteristika, wie die Migrations- und Differenzierungsfähigkeit und die Hypoimmunogenität, behalten.

Eine immer wiederkehrende Streitfrage bei der Verwendung von MSCs als Gentransfervehikel zur Krebstherapie ist die Diskrepanz in der Literatur bezüglich deren Einfluss auf das Tumorwachstum. Es existieren Studien, die auf eine wachstumsfördernde Eigenschaft der MSCs hinweisen, wohingegen in anderen Studien ein vermindertes Tumorwachstum beobachtet wurde (zusammengefasst von Klopp *et al.* 2011 (Klopp, Gupta, Spaeth, Andreeff & Marini, 2011)). Ein

Vergleich dieser Studien zeigte, dass der Einfluss der MSCs auf das Tumorwachstum von einer Vielzahl von Faktoren abhängt. Dazu zählen das Tumormodell, die Heterogenität der MSCs, die Dosis und der Zeitpunkt der MSC-Applikation und der Organismus, aus welchem diese gewonnen wurden (Klopp *et al.*, 2011). Für die Krebstherapie werden MSCs so verändert, dass sie nach Integration in das Tumorstroma suizidale, Apoptose-induzierende, anti-angiogenetische oder immunstimulatorische Gene exprimieren oder onkolytische Viren transportieren (zusammengefasst von Uchibori *et al.* 2014 (Uchibori, Tsukahara, Ohmine & Ozawa, 2014)). Eine potenzielle wachstumsfördernde Eigenschaft der MSCs kann somit durch eine gezielte Zerstörung dieser und der umliegenden Tumorzellen unterbunden werden.

Für die Verwendung von MSCs als Gentransfervehikel zur Krebstherapie sind Promotoren zur Kontrolle der Expression des therapeutischen Gens vorteilhaft, welche spezifisch im Tumorstroma aktiviert werden, da MSCs in den feinen Blutgefäßen mancher Organe eingeschlossen oder aufgrund ihrer migratorischen Kapazität, im Rahmen der Gewebshomöostase, nach systemischer Applikation, auch in weiteren Organen gefunden werden können (Hagenhoff *et al.*, 2016; Von Lutichau *et al.*, 2005). Das können Promotoren sein, welche durch die Differenzierung der MSCs innerhalb des Tumorstromas aktiviert werden, wie z.B. der *Regulated And Normal T cell Expressed and Secreted* (RANTES) Promoter oder solche, die durch die Signalkaskaden im Tumormilieu aktiviert werden, wie z.B. ein HIF-induzierbarer Promoter.

In Studien von Zischek *et al.*, Conrad *et al.* und Niess *et al.* wurde das Potenzial stabil transfizierter MSCs für eine MSC-basierte Gentherapie von orthotopen Pankreaskarzinomen, spontanen Brusttumoren und orthotopen Leberkarzinomen evaluiert (Conrad *et al.*, 2007; Niess *et al.*, 2011; Zischek *et al.*, 2009). Die Rekrutierung von MSCs in das Tumorstroma, welche mit dem Therapiegen Herpes-simplex-Virus Thymidinkinase (HSV-TK/TK) unter Kontrolle des Tumor-spezifischen RANTES oder Tie2 Promoters transfiziert waren, führte nach Applikation von Ganciclovir zu einem verminderten Tumorwachstum, einer geringeren Anzahl an Lebermetastasen und einem verlängerten Mausüberleben. Ein Vergleich dieser beiden Tumor-spezifischen Promotoren zeigte, dass der RANTES Promoter, welcher aktiviert wird, sobald die MSCs in das Tumorstroma migrieren und sich dort zu CAFs differenzieren, in dieser Therapiestrategie effizienter ist als der Tie2 Promoter, welcher in angiogenetischen „hot-spots“ aktiviert wird (Niess *et al.*, 2011). Auf der Grundlage dieser vielversprechenden präklinischen Ergebnisse wurde eine prospektive klinische Phase I/II Studie zur Evaluierung der Effektivität von MSCs, welche mit dem Therapiegen TK des HSV unter Kontrolle des RANTES Promoters transfiziert sind, in fortgeschrittenen, rezidierten oder metastasierten gastrointestinalen oder hepatopankreatobiliären Adenokarzinomen konzipiert (Niess *et al.*, 2015).

Trotz dieser vielversprechenden Ergebnisse mit der HSV-TK, kann die Strategie der MSC-basierten Gentherapie durch Verwendung des Natrium-Iodid-Symporters (NIS oder *SLC5A5*) als theranostisches Gen noch weiter modifiziert werden.

1.6 Natrium-Iodid-Symporter

1.6.1 Funktion von NIS

NIS ist ein transmembranes Glykoprotein mit 13 Transmembrandomänen, welches den aktiven Transport von Iodid in die Schilddrüse und in eine Reihe weiterer Organe, wie den Magen, die Speichel- und Tränendrüsen sowie die laktierende Brustdrüse, ermöglicht (Spitzweg, 2003). Der Iodidtransport in die Schilddrüse ist eine wichtige Voraussetzung für die Synthese der Schilddrüsenhormone T3 (3,3',5-Triiod-L-thyronin) und T4 (L-Thyroxin), welche eine essenzielle Rolle bei der Entwicklung und dem Stoffwechsel einer Vielzahl von Organen, insbesondere dem Nervensystem, spielen (Carrasco, 1993). Für die Synthese der Schilddrüsenhormone transportiert NIS ein Iodidion (I^-) gegen den elektrochemischen Gradienten und zwei Natriumionen (Na^+) entlang dem elektrochemischen Gradienten über die basolaterale Membran der Thyreozyten (Spitzweg, Harrington, Pinke, Vile & Morris, 2001; Spitzweg & Morris, 2002). Zur Aufrechterhaltung des Na^+ -Gradienten dient die Natrium-Kalium-ATPase, welche unter Hydrolyse von ATP drei Na^+ -Ionen aus der Zelle und zwei K^+ -Ionen in die Zelle transportiert (Spitzweg, Harrington, *et al.*, 2001; Spitzweg & Morris, 2002). Somit kann die Aufnahme von I^- -Ionen in die Schilddrüsenfollikelzelle durch den Natrium-Kalium-ATPase Inhibitor Ouabain oder durch kompetitive Inhibition von NIS, durch Thiocyanat (SCN^-) oder Perchlorat (ClO_4^-), gehemmt werden (Carrasco, 1993). Das Iodid wird anschließend durch Pendrin über die apikale Membran der Thyreozyten in das Schilddrüsenkolloid transportiert, durch die Schilddrüsenperoxidase oxidiert und an die Tyrosylreste von Thyreoglobulin gebunden (Scott, Wang, Kreman, Sheffield & Karniski, 1999; Spitzweg & Morris, 2002). Durch die Verbindung von zwei Iodtyrosinresten (Monoiodtyrosin oder Diiodtyrosin) werden die Schilddrüsenhormone T3 und T4 gebildet (Spitzweg, Harrington, *et al.*, 2001; Spitzweg & Morris, 2002). Diese werden im Kolloid gespeichert und bei Bedarf, geregelt durch das in der Hypophyse gebildete Thyreotropin (TSH), nach hydrolytischer Spaltung in die Blutbahn freigesetzt (Carrasco, 1993). Die Expression von NIS und seine korrekte Einlagerung in die Zellmembran wird durch TSH über den Adenylatcyclase-cAMP-Signalweg reguliert (Kogai & Brent, 2012).

1.6.2 NIS als Reporter- und Therapiegen

Neben der Schlüsselrolle von NIS in der Schilddrüsenhormonsynthese bildet es auch die Grundlage der diagnostischen Schilddrüsenzintigraphie sowie der therapeutischen Anwendung von Radioiod

bei der Therapie benigner und maligner Schilddrüsenerkrankungen (Spitzweg, 2003). Durch die funktionelle NIS-Expression in Schilddrüsenkarzinomzellen und -metastasen wird die Detektion und Ablation des restlichen Schilddrüsenkarzinomgewebes wie auch bereits gestreuter Metastasen nach der Operation ermöglicht (Spitzweg & Morris, 2004). Desweiteren können Rezidivtumoren bzw. Metastasen im Zuge der Nachsorgebehandlung identifiziert werden (Spitzweg & Morris, 2004). Die Quantifizierung der Radionuklidaufnahme im verbliebenen Schilddrüsenkarzinomgewebe ermöglicht zudem eine exakte dosimetrische Analyse der Tumor-absorbierten Dosis von ^{131}I , bevor dieses für die therapeutische Anwendung appliziert wird (Spitzweg & Morris, 2002). Das applizierte Radioiod wird in der Schilddrüse organifiziert, was zu einer erhöhten Retentionszeit im Tumorgewebe und damit zu einer erhöhten Tumor-absorbierten ^{131}I -Dosis führt (Spitzweg & Morris, 2004). Das macht die NIS-basierte Radioiodtherapie zu einer äußerst effizienten, sehr gut steuerbaren und damit sicheren Therapie, welche in einer personalisierten Weise eingesetzt werden kann (Spitzweg, 2003).

In Anlehnung an die seit mehr als 70 Jahren mit großem Erfolg beim Schilddrüsenkarzinom eingesetzte Radioiodtherapie, ermöglichte die Klonierung des *NIS* Gens im Jahr 1996 (Dai, Levy & Carrasco, 1996; Smanik *et al.*, 1996) die Entwicklung eines neuen, innovativen und zytoreduktiven Gentherapieansatzes (Spitzweg, 2003). Dieser basiert auf dem exogenen *NIS*-Gentransfer in thyreoidale und nicht-thyreoidale Tumoren, gefolgt von der Applikation verschiedener Radionuklide für diagnostische (^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$, ^{18}F -Tetrafluoroborat (^{18}F -TFB)) und therapeutische (^{131}I , ^{188}Re , ^{211}At) Anwendungen (Baril, Martin-Duque & Vassaux, 2010; Spitzweg & Morris, 2001; Youn, Jeong & Chung, 2010). Die duale Funktion von *NIS* als diagnostisches und therapeutisches Gen eröffnet somit neue Perspektiven in der Nuklearmedizin und molekularen Onkologie für eine theranostische Applikation von NIS auch außerhalb der Schilddrüse (Spitzweg, 2003) (Abb. 3).

Folgende Eigenschaften machen *NIS* zu einem idealen Reporter- und Therapiegen (zusammengefasst von Spitzweg 2003 (Spitzweg, 2003)):

- **NIS ist ein humanes Gen bzw. Protein**

NIS ist ein humanes Gen bzw. Protein, welches keine toxischen oder immunogenen Reaktionen hervorruft.

- **Duale Funktion von *NIS* als Reporter- und Therapiegen**

NIS kann sowohl als diagnostisches als auch therapeutisches Gen verwendet werden. Die Verwendung von *NIS* als Reporter gen ermöglicht nach Applikation von viralen und nicht-viralen Vektoren eine direkte und nicht-invasive Darstellung der endogenen und exogenen NIS-Expression in Echtzeit. Dadurch ist es möglich, die *in vivo* Verteilung der applizierten Vektoren

zu verfolgen und die Höhe und Dauer der NIS-Expression durch nuklearmedizinische Standardmethoden, wie die $^{99m}\text{Tc}/^{123}\text{I}$ -Szintigraphie (2-dimensional), ^{123}I -Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie (SPECT; 3-dimensional) oder ^{18}F -TFB-/ ^{124}I -Positronen-Emissions-Tomographie (PET; 3-dimensional), zu bestimmen. Dies wiederum ermöglicht eine exakte dosimetrische Berechnung der Tumor-absorbierten Dosis für therapeutische Radionuklide, wie ^{131}I , ^{188}Re oder ^{211}At . Die Tumor-absorbierte Dosis der verschiedenen Radionuklide sowie die Induktion eines therapeutischen Effekts ist hierbei abhängig von der Höhe der Radionuklidaufnahme, dem Radionuklidefflux, der Zerfallsrate sowie von der Möglichkeit einer Rezirkulation des Radionuklids. Für eine exakte anatomische Lokalisation der NIS-vermittelten Radionuklidaufnahme können diese Aufnahmen mit Schnittbildgebungen aus der Magnetresonanztomographie (MRT) oder der Computertomographie (CT) fusioniert werden.

- **Hohe Effizienz und Spezifität**

NIS ermöglicht schon seit vielen Jahrzehnten die Durchführung einer Radioiodtherapie zur Behandlung des differenzierten Schilddrüsenkarzinoms. Hierbei handelt es sich um eine gut etablierte Therapiemethode, welche, aufgrund der geringen NIS-Expression außerhalb der Schilddrüse, eine gute Toleranz und ein geringes Nebenwirkungsprofil zeigt.

- **Hoher *Bystander*-Effekt**

Die NIS-vermittelte Radioiodtherapie ist, aufgrund des „*Crossfire*-Effektes“ des β -Strahlers ^{131}I , mit einem signifikanten „*Bystander*-Effekt“ assoziiert, wodurch nicht nur die NIS-exprimierenden, sondern auch die benachbarten nicht-transfizierten Zellen zerstört werden. Das ermöglicht eine therapeutische Wirksamkeit auch bei limitierter Transduktionseffizienz.

- **Individualisierte *NIS* Gentherapie**

Die *NIS*-Gentherapie kann durch die Verwendung alternativer Radionuklide auf die jeweiligen Charakteristika des Tumors angepasst werden. Alternative Radionuklide zum β -Strahler ^{131}I (Halbwertszeit: 8 Tage, E: 0,134 MeV, therapeutische Reichweite: 2,6 – 5 mm) sind z.B. der β -Strahler ^{188}Re (Halbwertszeit: 16,7 h, E: 0,764 MeV, therapeutische Reichweite: 23 - 32 mm) oder der α -Strahler ^{211}At (Halbwertszeit: 7,2 h, E: 6,8 MeV), welche eine höhere Energie in einem kürzeren Zeitfenster freisetzen können.

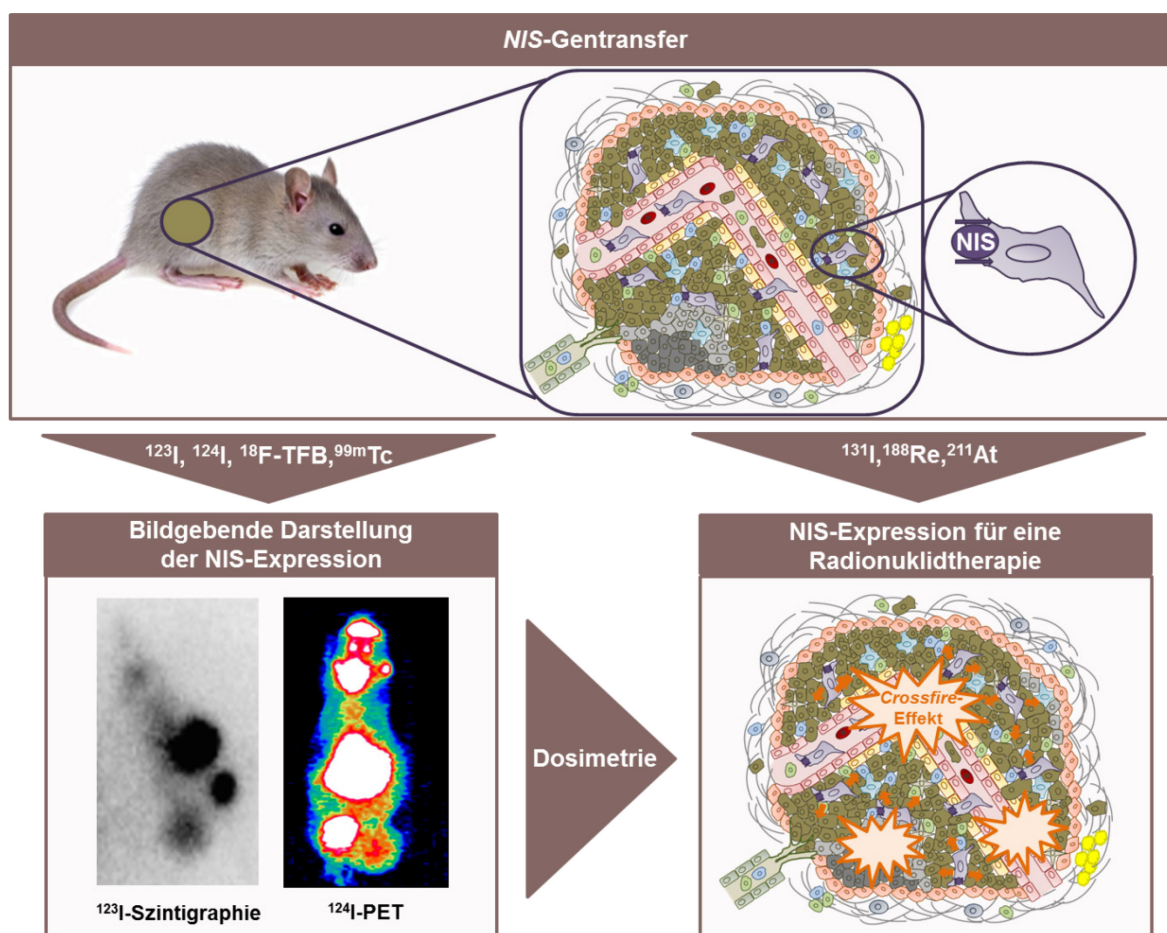


Abb. 3: Schematische Darstellung der Rolle von *NIS* als Reporter- und Therapiegen. Der *NIS*-Gentransfer ermöglicht eine direkte, nicht-invasive Darstellung der Vektorverteilung innerhalb des Organismus und der funktionalen *NIS*-Expression durch ^{123}I -/ $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Szintigraphie, ^{123}I -SPECT, ^{124}I -/ ^{18}F -TFB-PET sowie die Induktion eines therapeutischen Effekts nach der Injektion therapeutischer Radionuklide, wie ^{131}I , ^{188}Re , ^{211}At (Spitzweg, 2003). Durch diese duale Funktion als Reporter- und Therapiegen ermöglicht die Verwendung von *NIS* eine exakte dosimetrische Berechnung der benötigten Radionukliddosis, bevor diese für therapeutische Zwecke appliziert wird [in Anlehnung an (Spitzweg, 2003)].

1.6.3 *NIS*-Gentransferkonzepte

Das Konzept der *NIS*-vermittelten Radioiodtherapie nicht-thyreoidaler Tumoren wurde in einer Pionierstudie von Spitzweg *et al.* an Mäusen mit subkutanen Prostata Tumoren evaluiert (Spitzweg *et al.*, 2000). In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass in Prostatakarzinomzellen, welche stabil mit *NIS* unter Kontrolle eines Prostata-spezifischen Antigen (PSA) Promoters transfiziert waren, eine Radioiodakkumulation erzielt werden kann, die einen signifikanten therapeutischen Effekt ermöglichte. Um Prostatakarzinomzellen auch *in vivo* mit *NIS* transfizieren zu können, wurde in einer darauffolgenden Studie der adenovirale *NIS*-Gentransfer nach intratumoraler Injektion analysiert (Kakinuma *et al.*, 2003; Spitzweg, Dietz, *et al.*, 2001). Sowohl durch die Verwendung eines unspezifischen Cytomegalovirus (CMV) Promoters als auch durch den Gebrauch eines Prostata-spezifischen Probasin Promoters konnten *in vitro* und *in vivo* hohe Level an *NIS*-Expression erzielt

werden, die einen signifikanten Therapieeffekt von ^{131}I erlaubten. Diese vielversprechenden Ergebnisse konnten durch die Verwendung weiterer Tumormodelle bestätigt werden. So konnte durch die Verwendung des Carcinoembryonalen Antigen (CEA) Promoters, des Calcitonin Promoters oder des α -Fetoprotein (AFP) Promoters eine Tumor-spezifische Radioiodakkumulation in einem Kolonkarzinom-, einem medullären Schilddrüsenkarzinom- und einem Leberkarzinommausmodell induziert werden (Cengic *et al.*, 2005; Scholz *et al.*, 2005; Willhauck *et al.*, 2008). Aufbauend auf diesen Arbeiten wurde von Dwyer *et al.* das *NIS* Gentherapiekonzept zur Behandlung von Prostatakrebs vom Mausmodell auf ein höheres Lebewesen übertragen. In einem bildgebenden Versuch mit männlichen Beagles konnte gezeigt werden, dass nach der Injektion eines *NIS*-exprimierenden Adenovirus in die Prostata des Tieres eine hohe *NIS*-basierte Radioiodaufnahme zu beobachten ist (Dwyer *et al.*, 2005). Dies führte, aufbauend auf den Pionierarbeiten von Spitzweg *et al.* an der Mayo Clinic, zur Etablierung einer klinischen Studie zur Behandlung von rezidivierendem Prostatakrebs mit einem *NIS*-exprimierenden Adenovirus und ^{131}I als therapeutisches Radionuklid (NIH, 2016).

Diese *proof-of-principle* Studien zeigten das enorme Potenzial von *NIS* als Reporter- und Therapiegen. Für die klinische Anwendung ist allerdings eine systemische *NIS*-Applikation wünschenswert, um nicht nur Primärtumoren sondern auch Metastasen gezielt erreichen zu können. Für eine effiziente und sichere Anwendung des *NIS* Gentherapiekonzepts nach systemischer Vektorapplikation ist ein optimales Tumor-Targeting essenziell. Um dies zu erzielen, wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. C. Spitzweg drei verschiedene Gentransfermethoden getestet: Polyplex-vermittelter, Adenovirus-vermittelter und mesenchymaler Stammzell-vermittelter *NIS*-Gentransfer.

Für den Polyplex-vermittelten *NIS*-Gentransfer wurde von Klutz *et al.* die Effizienz und Tumorspezifität von pseudodendritischen Oligoaminen (G2-HD-OEI) in einem Neuroblastom- (Klutz *et al.*, 2009) und einem Leberkarzinommausmodell (Klutz, Willhauck, *et al.*, 2011) untersucht. Weiterhin wurden lineare Polyethylenimine, welche durch Polyethylenglycol abgeschirmt und mit dem synthetischen EGF-Rezeptor-spezifischen Peptid GE11 gekoppelt waren (LPEI-PEG-GE11), in einem Leberkarzinommausmodell (Klutz, Schaffert, *et al.*, 2011) analysiert. Mit beiden Polyplex-vermittelten Ansätzen für einen systemischen *NIS*-Gentransfer konnte nach Induktion einer Tumorspezifischen *NIS*-Expression ein signifikanter therapeutischer Effekt von ^{131}I erzielt werden. Durch die Verwendung der G2-HD-OEI Polymere konnte, bei vergleichbarer Tumorspezifität, im Leberkarzinommausmodell, im Vergleich zu den LPEI-PEG-GE11 Polymeren, eine höhere Radioiodaufnahme induziert werden. Allerdings sind für die G2-HD-OEI Polymere hypervaskularisierte Tumoren eine Voraussetzung für eine erfolgreiche Akkumulation im Tumor, wohingegen LPEI-PEG-GE11 Polymere, durch aktives Liganden-vermitteltes Tumor-Targeting, eine

effiziente Rezeptor-vermittelte Aufnahme in die Tumorzellen induzieren können, weswegen diese bei hypovaskularisierten Tumoren von noch größerer Bedeutung sein könnten (Klutz, Willhauck, *et al.*, 2011). In einer aktuelleren Studie von Urnauer *et al.* wurde der systemische NIS-Gentransfer unter Verwendung neuer *sequence-defined* Polymere, bestehend aus Polyethylenglycol und kationischen (Oligoethanoamino) Amidkernen gekoppelt mit dem cMET-spezifischen Liganden cMBP2, in einem Leberkarzinommausmodell untersucht (Urnauer *et al.*, 2016). Auch hier führte der Polyplex-vermittelte NIS-Gentransfer zu einem signifikant langsameren Tumorwachstum und einem längerem Mausüberleben nach Applikation von ¹³¹I.

Eine weitere vielversprechende Klasse von Gentransfermethoden für den systemischen NIS-Gentransfer sind die adenoviralen Vektoren. So wurde von Grünwald *et al.* die Effizienz und Tumorspezifität eines Replikations-selektiven onkolytischen Adenovirus getestet, bei welchem die E1A Region unter der Kontrolle des AFP Promoters und die NIS-Expression unter Kontrolle des Replikations-abhängigen E3 Promoters steht (Gruenwald, Klutz, *et al.*, 2013). Nach der intratumoralen Applikation dieses adenoviralen Vektors konnte ein signifikanter therapeutischer Effekt erzielt werden, welcher sowohl auf der NIS-vermittelten Radioiodaufnahme als auch auf der onkolytischen Aktivität des Virus beruhte. Im nächsten Schritt wurde sowohl der Replikations-selektive onkolytische Adenovirus als auch ein Replikations-inkompetenter Adenovirus mit *poly(amidoamine) dendrimers generation 5* umhüllt, um nach systemischer Applikation eine Akkumulation des Virus in der Leber zu verhindern (Gruenwald, Vetter, *et al.*, 2013b). Durch die Umhüllung des Virus konnte die Virusakkumulation in der Leber stark vermindert werden, was zu einer signifikant höheren Tumor-spezifischen Radioiodakkumulation, im Vergleich zu nicht umhüllten Viren, führte. Um diesen Ansatz weiter zu optimieren, wurden in einer nachfolgenden Studie die umhüllten Adenoviren mit dem bereits erwähnten EGF-Rezeptor-spezifischen Liganden GE11 gekoppelt (Gruenwald, Vetter, *et al.*, 2013a). Dies ermöglichte eine Steigerung der Tumorspezifität, da zum einen durch die Umhüllung die Akkumulation des Adenovirus in der Leber verhindert wurde und zum anderen durch das GE11 das aktive Tumor-Targeting erhöht werden konnte. Der Virus-vermittelte NIS-Gentransfer wurde bereits in einer klinischen Studie mit einem NIS-exprimierenden Masernvirus des Stamms Edmonston in Ovarialkrebspatienten analysiert (Galanis *et al.*, 2015). In dieser Studie wurde unter Verwendung von NIS als Reporter gen die Virusverteilung und NIS-Expression durch ¹²³I-SPECT/CT überprüft und führte, aufgrund der Virus-vermittelten Stimulation der Immunantwort gegen den Tumor und der onkolytischen Aktivität des Virus, zu einem verlängerten Überleben der Patienten.

Aufgrund des in Kapitel 1.5 ausführlich erläuterten Tumor-spezifischen Homings von MSCs, stellen genetisch modifizierte MSCs eine weitere vielversprechende Klasse von Gentransfermethoden für den systemischen NIS-Gentransfer dar. Zunächst wurde von Knoop *et al.* die generelle Effizienz von

MSCs als Transfervehikel für *NIS* in das Tumorstroma eines Leberkarzinommausmodells evaluiert (Knoop *et al.*, 2011). Die Expression von *NIS* wurde durch den unspezifischen CMV Promoter kontrolliert und führte zu einer signifikanten, *NIS*-vermittelten Radioiodakkumulation im Tumorstroma, welche zu einem verlangsamten Tumorwachstum und einem verlängerten Mausüberleben führte. Dieser Ansatz wurde durch die Verwendung des Tumor-spezifischen RANTES Promoters in einem Leberkarzinommausmodell weiter optimiert (Knoop, 2014; Knoop *et al.*, 2013). Die systemische Applikation dieser MSCs war auch mit einem signifikanten therapeutischen Effekt nach der *NIS*-vermittelten Radioiodakkumulation im Tumor verbunden, ermöglichte aber zusätzlich eine erhöhte Tumorspezifität. Ein primäres Ziel dieses Ansatzes war es, neben dem Primärtumor auch Metastasen gezielt und mit hoher Spezifität erreichen zu können, weshalb dieser Ansatz anschließend in einem Metastasenmodell getestet wurde. Die MSC-basierte *NIS* Gentherapie ermöglichte die Induktion einer signifikanten, *NIS*-vermittelten Radioiodakkumulation in disseminierten Lebermetastasen in einem Mausmodell für Kolonkarzinom-Lebermetastasen, was nach Applikation von ^{131}I zu einem langsameren Wachstum der Metastasen und zu einem längeren Mausüberleben führte (Knoop *et al.*, 2015).

Zusammenfassend konnte in diesen Studien gezeigt werden, dass durch die unterschiedlichen Gentransfersysteme, auch nach systemischer Applikation in nicht-thyreoidalen Tumoren, in Abwesenheit einer signifikanten Iod-Organifizierung, eine ausreichende ^{131}I -Aktivität im Tumor erreicht werden kann, um einen therapeutischen Effekt nach der *NIS*-vermittelten Radioiodakkumulation zu induzieren.

1.7 Genomische und nicht-genomische Effekte von Schilddrüsenhormonen

Die Schilddrüsenhormone T3 und T4 spielen eine wichtige Rolle beim Wachstum, der Entwicklung und Zelldifferenzierung, im Rahmen der meisten anabolen und katabolen Stoffwechselwege, und bei vielen Reaktionen des Struktur- und Funktionsstoffwechsels (Köhrle, Schomburg & Schweizer, 2014). In den letzten Jahren konnte in zahlreichen Untersuchungen gezeigt werden, dass sie auch die Bildung des Tumorstromas, durch Stimulation von Angiogenese, Proliferation und Inflammation, wesentlich beeinflussen können (P. J. Davis *et al.*, 2009; P. J. Davis, Davis, Mousa, Luidens & Lin, 2011). Diese Effekte können durch genomische und nicht-genomische Mechanismen vermittelt werden, welche in ihren Signalwegen partielle Überschneidungen aufweisen. Zur Einleitung der genomischen Effekte bindet das Schilddrüsenhormon T3 an die Schilddrüsenhormonrezeptoren (TR), welche an den Schilddrüsenhormon-responsiven Elementen in der Promoterregion der Schilddrüsenhormon-induzierten Gene, als Homodimere oder Heterodimere mit dem Retinoid X Rezeptor, gebunden sind (Moeller & Broecker-Preuss, 2011). Dies führt zur Dissoziation der Schilddrüsenhormonrezeptor-Homodimere, zur Bildung von

Heterodimeren, zu einer Freisetzung von Co-Repressoren und zu einer Rekrutierung von Co-Aktivatoren, wodurch die Expression von Schilddrüsenhormon-induzierten Genen eingeleitet wird (Moeller & Broecker-Preuss, 2011). Die nicht-genomischen Effekte treten schneller ein und enden nicht zwangsläufig im Nukleus zur Induktion der Genexpression (P. J. Davis, Goglia & Leonard, 2016). Die ersten nicht-genomischen Effekte, die beobachtet wurden, sind die Stimulation der mitochondrialen Atmung durch T3 über den mitochondrialen Rezeptor p43 und die Modulation des Aktin Zytoskeletts durch T4 und *reverse* T3 über eine verkürzte TR α Isoform im Zytoplasma (P. J. Davis *et al.*, 2016; Siegrist-Kaiser, Juge-Aubry, Tranter, Ekenbarger & Leonard, 1990; Sterling, Brenner & Sakurada, 1980). Über die Zeit wurden immer weitere nicht-genomische Effekte von Schilddrüsenhormonen erforscht. Dazu zählt u.a. die Regulation der Osteogenese durch T3 über den Plasmamembran-ständigen Rezeptor p30 TR α 1 und die Regulation des Natrium-Protonen-Antiporters, des Natrium-Calcium-Antiporters und der Natrium-Kalium-ATPase (D'Arezzo *et al.*, 2004; Kalyanaraman *et al.*, 2014; Lei, Bhargava & Ingbar, 2009; Lei, Mariash & Ingbar, 2004; Rudinger, Mylotte, Davis, Davis & Blas, 1984). Alle nicht-genomischen Effekte werden entweder über Rezeptoren vermittelt, welche eine strukturelle Ähnlichkeit zu den Schilddrüsenhormonrezeptoren im Nukleus aufweisen, wie z.B. die verkürzte TR α Form in den Mitochondrien, dem Zytoplasma und der Plasmamembran, oder über Rezeptoren, welche sich strukturell von den Schilddrüsenhormonrezeptoren im Nukleus unterscheiden, wie z.B. den im Jahr 2005 entdeckten Plasmamembranrezeptor für Schilddrüsenhormone am Integrin $\alpha\beta$ 3 (Bergh *et al.*, 2005).

Das Integrin $\alpha\beta$ 3 ist ein transmembranes Glykoprotein, welches in der Membran von Endothelzellen, vaskulären glatten Muskelzellen, Krebszellen, Osteoklasten und in geringerem Maß auch in der Membran von Muskelzellen und Thrombozyten lokalisiert ist und mit dem EGF-Rezeptor in direktem Kontakt steht (Cai & Chen, 2006; Kasirer-Friede, Kahn & Shattil, 2007; Sinanan, Machell, Wynne-Hughes, Hunt & Lewis, 2008; Yang *et al.*, 2008). Neben den Bindungsstellen für die Komponenten der EZM, welche über das Arg-Gly-Asp Aminosäuremotiv erkannt werden, weist das Integrin auch zwei Bindungsstellen für die Schilddrüsenhormone T3 und T4 und für den Schilddrüsenhormonmetabolit Tetrac auf (P. J. Davis *et al.*, 2009; P. J. Davis *et al.*, 2011). Die eine Bindungsstelle des Rezeptors bindet nur T3 und induziert die Aktivierung des Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) Signalwegs, über die *cellular und sarcoma* (Src) Kinase, durch welchen der Schilddrüsenhormonrezeptor TR α 1 phosphoryliert wird. Dieser transloziert anschließend vom Zytoplasma in den Zellkern und fördert die Expression von HIF-1 α , GLUT-1 oder dem *regulator of calcineurin 2* (P. J. Davis *et al.*, 2009; P. J. Davis *et al.*, 2011). Die andere Bindungsstelle bindet T3 sowie mit einer höheren Affinität T4 und induziert die Aktivierung des *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) 1 und 2 Signalwegs über die Phospholipase C (PLC) und die Proteinkinase C α (PKC α)

(P. J. Davis *et al.*, 2009; P. J. Davis *et al.*, 2011). Dies hat zur Folge, dass der Schilddrüsenhormonrezeptor TR β 1, der Östrogenrezeptor ER α und *Signal Transducer and Activator of Transcription* (STAT) 1 und STAT3 phosphoryliert wird und vom Zytoplasma in den Zellkern transloziert (P. J. Davis *et al.*, 2009; P. J. Davis *et al.*, 2011). STAT1 und STAT3 können daraufhin die Aktivität verschiedener Zytokine und Wachstumsfaktoren modulieren (P. J. Davis *et al.*, 2009). Durch die Aktivierung des MAPK Signalwegs werden somit die Tumorzellproliferation (F. B. Davis *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2007; Tang, Lin, Zhang, Davis & Davis, 2004) und die Angiogenese (Bergh *et al.*, 2005; F. B. Davis *et al.*, 2004) beeinflusst. Tetrac, ein deaminiertes T4 Derivat, verdrängt T3 und T4 vom Rezeptor und ist somit ein spezifischer Inhibitor der Schilddrüsenhormone am Integrin $\alpha\beta$ 3 (P. J. Davis *et al.*, 2009; P. J. Davis *et al.*, 2011). Tetrac kann diese Effekte nicht nur inhibieren, sondern weist auch in Abwesenheit von T3 und T4 anti-proliferative und anti-angiogenetische Eigenschaften auf (P. J. Davis *et al.*, 2011). In diesem Zuge beeinflusst es u.a. die Expression von Thrombospondin 1, Caspase-2 und *chibby family member 1* (P. J. Davis *et al.*, 2011). Ein weiterer partieller Inhibitor der Effekte von T3 und T4, vermittelt durch das Integrin $\alpha\beta$ 3, ist das RGD (Arg-Gly-Asp) Peptid. Dieses hemmt die Wirkung von T3 an der T3 Bindungsstelle und die Wirkung von T4 an der T3/T4 Bindungsstelle, nicht aber die Wirkung von T3 an der T3/T4 Bindungsstelle (P. J. Davis *et al.*, 2009; P. J. Davis *et al.*, 2011) (Abb. 4).

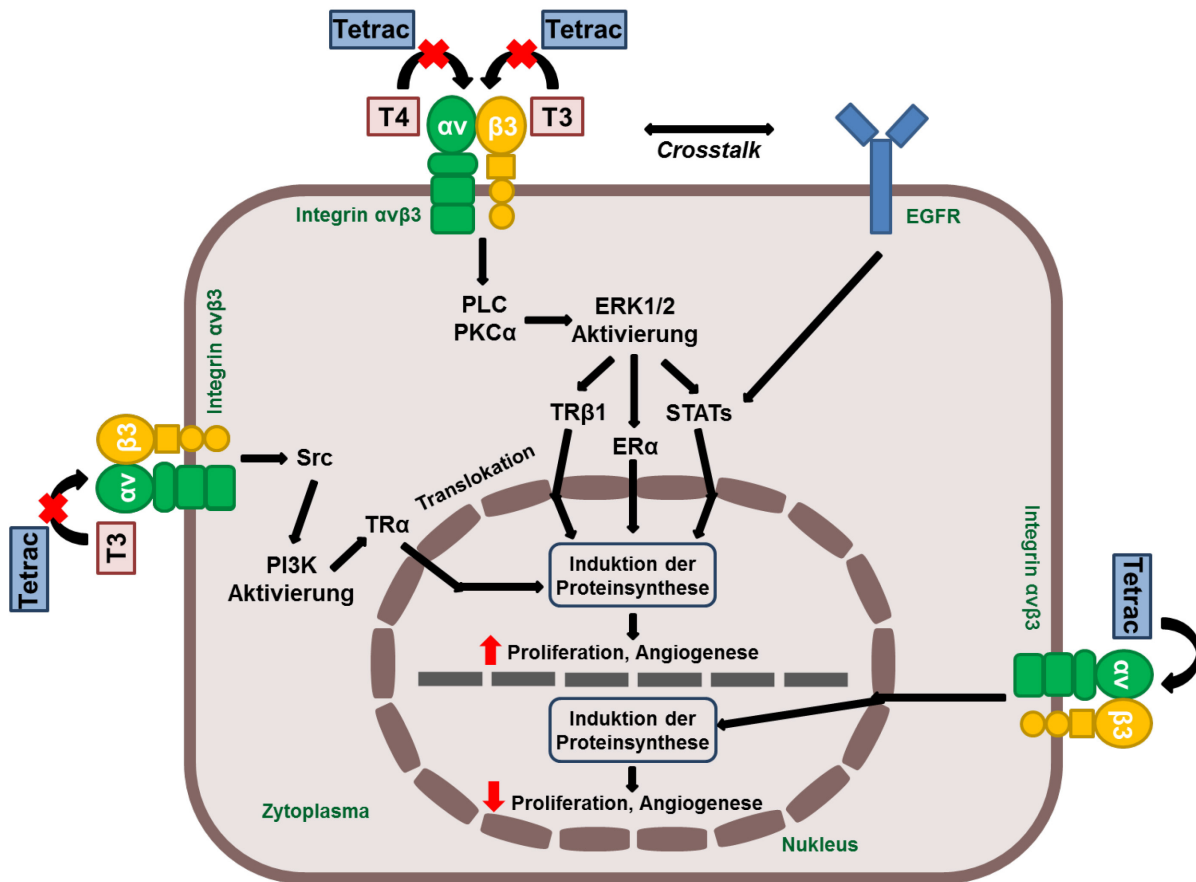


Abb. 4: Nicht-genomische, Integrin $\alpha\text{v}\beta 3$ -vermittelte Schilddrüsenhormoneffekte. Die Schilddrüsenhormone T3 und T4 können durch nicht-genomische, Integrin $\alpha\text{v}\beta 3$ -vermittelte Effekte die Proteinsynthese beeinflussen und dadurch Proliferation und Angiogenese induzieren. Der Schilddrüsenhormonmetabolit Tetrac kann diese Wirkungen hemmen und hat auch in Abwesenheit von T3 und T4, nach Induktion der Proteinsynthese, anti-proliferative und anti-angiogenetische Effekte [in Anlehnung an (P. J. Davis *et al.*, 2009)].

1.8 Effekte von Schilddrüsenhormonen auf die HIF-1 α -Expression und -Stabilisierung

Die Schilddrüsenhormone T3 und T4 können die HIF-1 α -Aktivität durch genomische und nicht-genomische Signalwege beeinflussen. Diese Eigenschaften sind Rezeptor- und Zell-spezifisch (Burrows *et al.*, 2011). Auf genomischem Weg kann T3 die Expression von HIF-1 α in einer Reihe von Karzinomzelllinien steigern, indem es die Expression des Transkriptionsfaktors *hepatic leukemia factor* fördert (Otto & Fandrey, 2008). In Studien mit Endothelzellen oder Fibroblasten konnte gezeigt werden, dass T3 auf nicht-genomischem Weg die HIF-1 α -Expression steigert, indem es die Interaktion von TR α oder TR β mit p85 erhöht, wodurch es zu einer verstärkten Aktivierung von der PI3K kommt (Hiroi *et al.*, 2006; Moeller, Cao, Dumitrescu, Seo & Refetoff, 2006; Palmer, Semenza, Stoler & Johns, 1998). Die nicht-genomische Aktivierung des PI3K Signalwegs durch T3 in Glioblastomzellen induziert die Translokation des TR α vom Zytoplasma in den Nukleus und dadurch die Einleitung der HIF-1 α -Expression (Lin *et al.*, 2009). Neben der Induktion der HIF-1 α -Expression konnte in Magenkarzinomzellen gezeigt werden, dass T3 auch die Stabilität des Proteins

beeinflussen kann, indem es das Enzym Fumarathydratase inhibiert, was zu einer erhöhten Konzentration an Fumarat führt (Liu *et al.*, 2009). Das Fumarat wiederum kann das Enzym PHD 2 inhibieren, wodurch es zu einer verminderten Hydroxylierung und somit zu einem verminderten Abbau von HIF-1 α kommt (Liu *et al.*, 2009). T4 konnte nicht-genomisch in Glioblastomzellen und Affennierenzellen die HIF-1 α -Expression durch eine Aktivierung des ERK1/2 Signalwegs beeinflussen, was zu einer erhöhten T4/TR β Interaktion führt (Lin *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2003). Die erhöhte Menge an HIF-1 α ermöglicht wiederum die Steigerung der Expression einer Reihe von Hypoxie-induzierten Genen, wie z.B. *GLUT1* (GLUT-1), *MCT4* (MCT 4), *PFKP* (PFKP) und *STC1* (STC-1) (Burrows *et al.*, 2011) (Abb. 5).

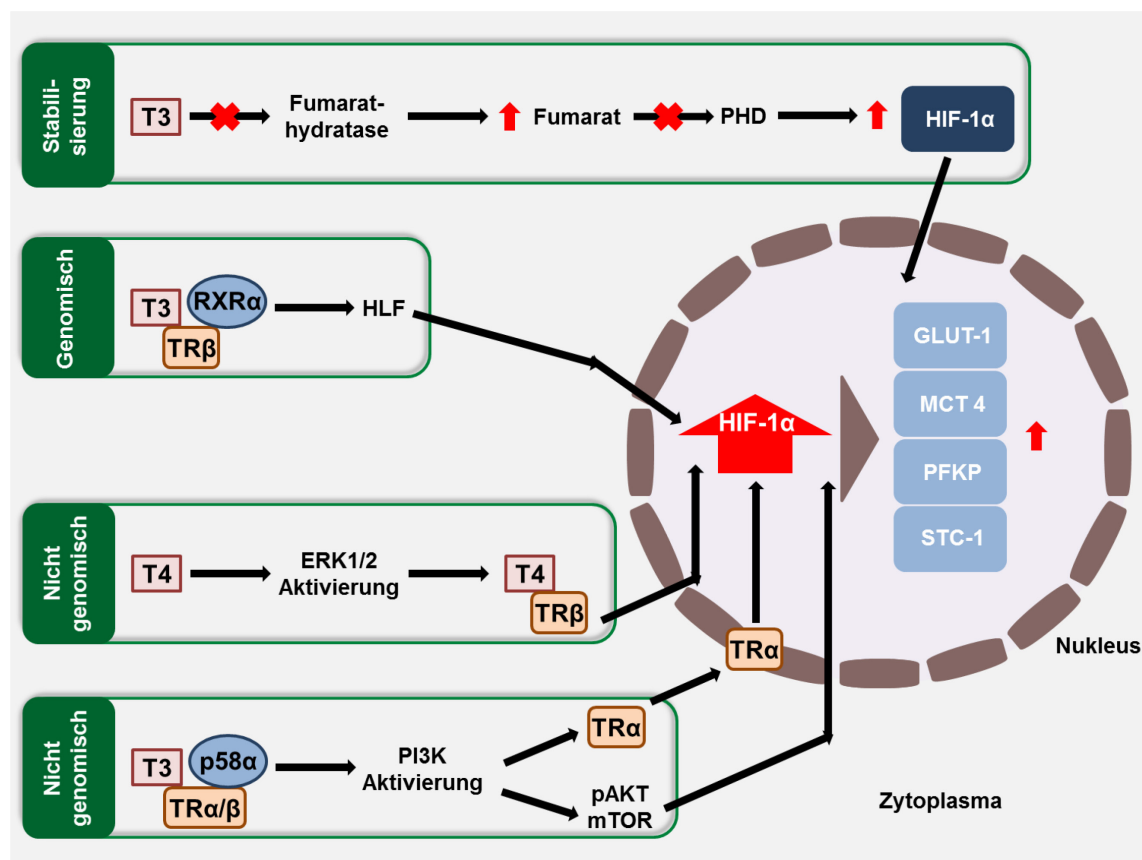


Abb. 5: Schilddrüsenhormon-basierte Regulation von HIF-1 α . Die Schilddrüsenhormone T3 und T4 können durch genomische und nicht-genomische Signalwege die HIF-1 α -Expression und Stabilität beeinflussen [in Anlehnung an (Burrows *et al.*, 2011)].

1.9 Hypo- und athyreote Tiermodelle

Schilddrüsenhormone spielen, wie in den vorherigen Kapiteln bereits beschrieben, eine wichtige Rolle in einer Reihe von physiologischen und pathophysiologischen Prozessen (Köhrle *et al.*, 2014). Um die Wirkungsweise der Schilddrüsenhormone genauer analysieren zu können, wurden verschiedene hypo- bzw. athyreote Tiermodelle generiert. Diese Tiere können anschließend mit einer definierten Dosis an T3, T4 oder Schilddrüsenhormonmetaboliten behandelt und deren

Auswirkung auf verschiedene Stoffwechselwege untersucht werden. Eine weit verbreitete Methode zur Etablierung eines hypothyreoten Tiermodells ist die Verabreichung verschiedener Substanzen über das Trinkwasser, welche die Schilddrüsenhormonsynthese blockieren. Mit dieser Methode können allerdings nur sehr eingeschränkt Schilddrüsenhormoneffekte auf die NIS-Expression im Tumorstroma nach systemischem Virus-, Polyplex- oder MSC-vermittelten NIS-Gentransfer, wie in Kapitel 1.6 beschrieben, durch eine bildgebende Darstellung der NIS-vermittelten Radionuklidaufnahme bestimmt werden. Dies ist auf eine mit dem Schilddrüsenhormonstatus variierende TSH-Konzentration und auf eine TSH-abhängige NIS-Expression in der Schilddrüse zurückzuführen (Ross, Downing, Chin, Kieffer & Ridgway, 1983a, 1983b; Ross, Downing, Chin & Ridgway, 1984; Shupnik *et al.*, 1983). Aufgrund der mit dem Schilddrüsenhormonstatus-variierten, NIS-vermittelten Radionuklidaufnahme in die Schilddrüse, ist für eine exakte Analyse der Schilddrüsenhormoneffekte im Tumorstroma eine Elimination des Schilddrüsen-„Sink“-Effekts eine wichtige Voraussetzung. Dieser kann durch die Trinkwasser-induzierte Hypothyreose nicht eliminiert werden. Ein weiterer Nachteil der Trinkwasser-induzierten Hypothyreose ist die Verwendung von Thioamiden (z.B. Methimazol und Propylthiouracil), welche die NIS-Expression in der Schilddrüse beeinflussen, und Perchlorat, welches wie bereits in Kapitel 1.6 beschrieben, die NIS-vermittelte Radionuklidaufnahme hemmt, wodurch keine Verwendung von NIS als Reportergen möglich ist (Spitzweg, Joba, Morris & Heufelder, 1999). Zusätzlich müssen die Tiere, zur Blockierung der Schilddrüsenhormonsynthese, über einen längeren Zeitraum mit diesen Substanzen behandelt werden. Diese Substanzen können zudem zu verschiedenen Nebenwirkungen führen sowie die unterschiedliche Menge der Wasseraufnahme der Tiere zu Schwankungen im Schilddrüsenhormonstatus führen kann (Bandyopadhyay, Biswas & Banerjee, 2002; Cano-Europa, Blas-Valdivia, Franco-Colin, Gallardo-Casas & Ortiz-Butron, 2011). Aus den oben genannten Gründen stellt die Trinkwasser-induzierte Hypothyreose keine ideale Methode zur Etablierung eines hypothyreoten Tiermodells, v.a. mit dem Ziel der Verwendung von NIS als Reportergen, dar. Um die Problematik der variablen, TSH-abhängigen und damit vom Schilddrüsenhormonstatus-abhängigen NIS-Expression in der Schilddrüse zu umgehen, können athyreote Tiermodelle generiert werden. Für die Etablierung athyreoter Tiere kann die Schilddrüse entweder durch eine Thyreoidektomie entfernt oder das Schilddrüsengewebe kann gezielt durch eine ¹³¹I-induzierte Schilddrüsenablation zerstört werden (Marks & Mitchell, 1971). Da die Thyreoidektomie mit einem großen operativen Aufwand verbunden ist und die komplette Elimination des Schilddrüsengewebes schwierig sein kann, v.a. bei kleineren Tiermodellen wie der Maus, stellt die ¹³¹I-induzierte Schilddrüsenablation eine einfache und vielversprechende Methode zur Generierung eines athyreoten Tiermodells dar, welche die Verwendung von NIS als Reportergen ermöglicht. Um ein athyreotes Tiermodell generieren zu

können, ist eine wesentliche Voraussetzung das Erstellen eines Protokolls, bei welchem mit minimaler Toxizität die Schilddrüse vollständig ablatiert werden kann.

1.10 Ziele der Arbeit

MSCs weisen eine Reihe von Eigenschaften auf, die sie zu idealen Gentransfervehikeln zum Transport therapeutischer Gene in das Tumorstroma werden lassen, wie z.B. ihr Tumortropismus (Dwyer *et al.*, 2010). Ein vielversprechendes Therapiegen mit einem signifikanten *Bystander*-Effekt stellt dabei *NIS* dar, nicht zuletzt aufgrund seiner Doppelfunktion als Reporter- und Therapiegen (Spitzweg & Morris, 2002). In seiner Funktion als Reportergen ermöglicht es eine nicht-invasive Analyse der MSC-Biodistribution sowie eine Bestimmung der Dauer und der Höhe der *NIS*-Expression durch nuklearmedizinische Standardmethoden und somit auch eine exakte dosimetrische Berechnung der Tumor-absorbierten Dosis von ^{131}I , bevor diese für eine therapeutische Anwendung appliziert wird (Baril *et al.*, 2010; Spitzweg & Morris, 2001; Youn *et al.*, 2010).

Daraus folgend etablierten Knoop *et al.*, wie bereits beschrieben, MSCs, welche *NIS* stabil unter Kontrolle verschiedener Promotoren exprimieren und nach systemischer Applikation in ein subkutanes Leberkarzinom-, in ein orthotopes Leberkarzinommausmodell oder in ein Mausmodell mit Kolonkarzinom-Lebermetastasen und anschließender ^{131}I -Injektion zu signifikanten therapeutischen Effekten führten (Knoop *et al.*, 2011; Knoop *et al.*, 2013; Knoop *et al.*, 2015).

Eine große Herausforderung in der Krebstherapie stellen hypoxische Tumorzellen dar, da diese resistent gegenüber konventionellen Therapiemethoden, wie Chemo- und Strahlentherapie, sind und Tumoren mit einem hohen Grad an Hypoxie mit einer schlechten Prognose assoziiert sind (Hockel & Vaupel, 2001; Y. Kim *et al.*, 2009). Daher ist das Interesse an der Entwicklung von Therapiestrategien zur gezielten Zerstörung dieser hypoxischen Tumorzellen immens.

Darauf basierend war das erste Ziel der Arbeit die Evaluierung des Potenzials einer MSC-vermittelten, Hypoxie-induzierten, *NIS*-basierten Radioiodtherapie in einem subkutanen und orthotopen Leberkarzinommausmodell. Hierfür wurden MSCs etabliert, welche *NIS* stabil, unter der Kontrolle eines HRP, exprimieren. Diese MSCs wurden daraufhin *in vitro*, unter Simulation eines hypoxischen Milieus, charakterisiert. Anschließend wurde sowohl deren Rekrutierung in das Tumorstroma nach systemischer Applikation als auch die Hypoxie-induzierte, *NIS*-vermittelte Radionuklidaufnahme *in vivo* durch verschiedene bildgebende Modalitäten, wie ^{123}I -Szintigraphie, $^{124}\text{I}/^{18}\text{F}$ -TFB-PET und *ex vivo* durch ^{123}I -Biodistributionsanalyse und Immunhistochemie, bestimmt. Daraufhin wurde deren therapeutisches Potenzial nach einer HIF-*NIS*-MSC-vermittelten ^{131}I -Therapie durch Kontrastmittel-unterstützten Ultraschall analysiert.

Um einen detaillierteren 3-dimensionalen Einblick in das Wachstum des orthotopen Tumors, die Tumervaskularisierung und die MSC-Rekrutierung zu erhalten, war das zweite Ziel der Arbeit die Evaluierung des Potenzials einer Analyse dieser Aspekte durch 3D-Lichtblattfluoreszenzmikroskopie.

Auf der Grundlage, dass die Schilddrüsenhormone T3 und T4 einen großen Einfluss auf die Bildung des Tumorstromas aufweisen und in diesem Zusammenhang auch die Expression von HIF-1 α induzieren können (P. J. Davis *et al.*, 2009; P. J. Davis *et al.*, 2011), war das dritte Ziel der Arbeit die Analyse der Effekte der Schilddrüsenhormone T3 und T4 und des Schilddrüsenhormonmetaboliten Tetrac auf das Hypoxie-responsive Netzwerk in MSCs.

Mit dem Ziel, die Wirkung der Schilddrüsenhormone T3 und T4 auf das Hypoxie-responsive Netzwerk in MSCs auch *in vivo* analysieren zu können, war das vierte Ziel dieser Arbeit die Etablierung eines Protokolls zur Generierung eines athyreoten Mausmodells durch eine ¹³¹I-induzierte Schilddrüsenablation, welches die Verwendung von *NIS* als Reportergen ermöglicht.

Die Ergebnisse dieser Arbeit ermöglichen es, eine neue Therapiestrategie für Leberkarzinompatienten aufzuzeigen und den Einfluss des Schilddrüsenhormonstatuts eines Patienten auf den Erfolg dieser neuen Therapiestrategie zu bewerten.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 1: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Bezeichnung	Hersteller
Deckgläschen	-	Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland
Einwegklingen für das Kryotom	Low-profile disposable blades	Leica, Wetzlar, Deutschland
Filter für Flaschen	Nalgene® 596-4520 Rapid- Flow™ Sterile Bottle Top Filter	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Filter für Spritzen	Spritzenfilter (0,2 µm Porengröße)	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Kryoröhrchen	Nunc™ CryoTube™ Vials	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Küvetten	UVette®	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Nitrozellulosemembran für Western Blot	Nitrocellulose Pre-Cut Blotting Membrane	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Objektträger	Objektträger SuperFrost® Plus	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
qRT-PCR (Quantitative Echtzeit-Polymerase- kettenreaktion) Platten	Eppendorf twin.tec® PCR Plates	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Schwammkissen für Western Blot	Sponge Pad for Blotting	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

Versiegelungsfolien für qRT-PCR Platten	Heat Sealing PCR Film and Foil	VWR, Radnor, Pennsylvania, USA
Western Blot Film	Carestream® Kodak® BioMax® MR Film	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA

2.1.2 Plasmide und Vektoren

Tabelle 2: Plasmide und Vektoren

Plasmid	Quelle	Antibiotikums-resistenz Eukaryoten	Antibiotikums-resistenz Prokaryoten	Verwendung
pcDNA3-CMV-NIS	SM Jhiang, Ohio State University, Columbus, OH, USA	Geneticin	Ampicillin	Klonierung des <i>NIS</i> Gens
pGL3-HIF-LUC	F Grässer, Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg, Deutschland	Blasticidin	Ampicillin	Grundgerüst für den pGL3-HIF-NIS-Vektor

2.1.3 Zelllinien und primäre Zellen

Tabelle 3: Zelllinien und primäre Zellen

Zelle	Beschreibung	Quelle	Medium
AP172-1 (hBMSCs)	Humane, primäre MSCs aus dem Knochenmark	Apceth, München, Deutschland	DMEM + 10% FBS (v/v) + 1% P/S (v/v) + 5% Thrombozyten (v/v) + 2 Einheiten Heparin/ml

CMV-NIS-MSC	WT-MSCs stabil transfiziert mit dem Expressionsvektor pcDNA3-CMV-NIS	Etabliert von K Knoop, Medizinische Klinik und Poliklinik II, Klinikum der Universität München, München, Deutschland (Knoop <i>et al.</i> , 2011)	RPMI 1640 + 10% FBS (v/v) + 1% P/S (v/v) + 1% Geneticin (v/v)
HIF-NIS-HuH7	HuH7 stabil transfiziert mit dem Expressionsvektor pGL3-HIF-NIS	Selbst etabliert	DMEM + 10% FBS (v/v) + 1% P/S (v/v) + 5 µg/ml Blasticidin S HCl
HIF-NIS-MSC	WT-MSCs stabil transfiziert mit dem Expressionsvektor pGL3-HIF-NIS	Selbst etabliert	RPMI 1640 + 10% FBS (v/v) + 1% P/S (v/v) + 5 µg/ml Blasticidin S HCl
HuH7	Humane Leberkarzinomzelllinie	JCRB Cell Bank, Osaka, Japan	DMEM + 10% FBS (v/v) + 1% P/S (v/v)
WT-MSC	Humane, <i>SV40 large T antigen</i> immortalisierte MSCs aus dem Knochenmark	Etabliert von K Thalmaier <i>et al.</i> , Helmholtz Zentrum München, München, Deutschland (Thalmeier <i>et al.</i> , 1994)	RPMI 1640 + 10% FBS (v/v) + 1% P/S (v/v)

2.1.4 Kulturmedien und Zusätze für die Zellkultur

2.1.4.1 Zellkulturmedien

Tabelle 4: Zellkulturmedien

Medium	Hersteller/Zusammensetzung
Einfriermedium	95% FBS (v/v), 5% DMSO (v/v)
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
RPMI 1640 Medium	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA

2.1.4.2 Zellkulturzusätze

Tabelle 5: Zellkulturzusätze

Zusatz	Hersteller
3,3',5,5'-Tetraiodothyroacetic acid (Tetrac)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
3,3',5-Triiodo-L-thyronin-Natriumsalz (T3)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Blasticidin S HCl	Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Cobalt(II)chlorid-Hexahydrat (CoCl ₂)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Fetales Kälberserum (FBS) Superior	Superior, Biochrom/Merck Millipore, Berlin, Deutschland
G418-Disulfat-Salzlösung (Geneticin)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Heparin-Natrium-250000-ratiopharm®	Ratiopharm, Ulm, Deutschland
InSolution™ LY294002	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
L-Thyroxin (T4)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Penicillin/Streptomycin (P/S)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
RAF265	Novartis, Basel, Schweiz
Thrombozyten	Blutbank Schwabing-West, München, Deutschland

2.1.4.3 Andere Zellkulturreagenzien

Tabelle 6: Andere Zellkulturreagenzien

Zellkulturreagenz	Hersteller
CellTracker™ Deep Red	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland/Merck, Darmstadt, Deutschland
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Ethylendiamintetraessigsäurelösung (EDTA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Lipofectamine® Transfection Reagent	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
PLUS™ Reagent	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Poly(2-hydroxyethylmethacrylat) (PolyHEMA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Trypsin-EDTA-Lösung	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA

2.1.5 Bakterien und Wachstumsmedien

2.1.5.1 Bakterien

Tabelle 7: Bakterien

Bakterium	Hersteller
Library Efficiency® DH5α™ Competent Cells	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

2.1.5.2 Wachstumsmedien für Bakterien

Alle Medien wurden in destilliertem Wasser angesetzt.

Tabelle 8: Wachstumsmedien für Bakterien

Medium	Hersteller/Zusammensetzung
Einfriermedium	60% (v/v) Glycerin
Lysogeny broth- (LB-) Medium	2% Trypton (w/v), 1% Hefeextrakt (w/v), 342 mM NaCl, pH 7,5 (Raumtemperatur (RT))

Super Optimal broth with Catabolite repression- (S.O.C.-) Medium	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
--	---

2.1.6 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 9: Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie	Hersteller
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
2-Amino-2(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol (Tris)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
2-Propanol (Isopropanol)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
3-Amino-9-ethylcarbazol (AEC)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Aceton	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agarose	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Aktivkohle	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Ampicillin-Natriumsalz	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
D(+)-Glukose	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dextran von Leuconostoc mesenteroides	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Eosin scharlach	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Ethanol (vergällt/reinst)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Fluorescence Mounting Medium	Dako, Carpinteria, Kalifornien, USA
Formaldehydlösung	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycergel® Mounting Medium	Dako, Carpinteria, Kalifornien, USA
Glycerin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Harnstoff	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Hefeextrakt	Thermo Fisher Scientific Oxoid, Basingstoke, England

Iodid	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Kaisers Glyceringelatine	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumperchlorat (KClO ₄)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Malachitgrün-Oxalat	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Milchpulver Blotting-Grade Blocker Non-Fat Dry Milk	Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA
N,N-Dimethylformamid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumacetat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland/Applichem, Darmstadt, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Natriumiodid (NaI)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumzitat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natronlauge (NaOH)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Normales Ziegenserum	Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornien, USA
Nuklease-freies Wasser	Qiagen, Venlo, Niederlande
Salzsäure	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Select Agar®	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Tissue Tek® O.C.T.™	OMNILAB, München, Deutschland
Trichloressigsäure	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Triton® X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Trizma® base	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Trizma® Hydrochlorid	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Trypton	Thermo Fisher Scientific Oxoid, Basingstoke, England
UltraPure™ DNase/RNase-freies destilliertes Wasser	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

VECTASHIELD® Mounting Medium	Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornien, USA
Wasserstoffperoxidlösung (H ₂ O ₂) (30%)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Xylol (Isomere)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Zitronensäure	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA

2.1.7 Radionuklide

Tabelle 10: Radionuklide

Radionuklid	Hersteller
¹²³ I (Natriumiodid)	GE Healthcare, Little Chalfont, England
¹²⁴ I (Natriumiodid)	PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, USA
¹²⁵ I (Natriumiodid)	PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, USA
¹³¹ I (Natriumiodid)	GE Healthcare, Little Chalfont, England
¹⁸ F-TFB	Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin, Klinikum rechts der Isar, München, Deutschland
^{99m} Tc-Pertechnetat	Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin, Klinikum der Universität München, München, Deutschland

2.1.8 Puffer, Lösungen und Gele

2.1.8.1 Kommerziell erworben

Tabelle 11: Kommerziell erworbene Puffer, Lösungen und Gele

Puffer/Lösung/Gel	Hersteller
Antibody Diluent, Background Reducing	Dako, Carpinteria, Kalifornien, USA
DNA Gel Loading Dye (6×)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
ECL™ Blotting Reagents	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Hämatoxylinlösung	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA/Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornien, USA

Halt™ Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS)	Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
Hoechst 33258 Lösung	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
M-PER® Mammalian Protein Extraction Reagent	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
NuPAGE® LDS Sample Buffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
NuPAGE® Sample Reducing Agent	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
NuPAGE® Transfer Buffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
NuPAGE™ Novex™ 4-12% Bis-Tris Protein Gels	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Peroxidase-konjugiertes Streptavidin	Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pennsylvania, USA
Phosphat-gepufferte Salzlösung	Apotheke, Klinikum der Universität München, München, Deutschland
Protein Assay Dye Reagent Concentrate	Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA
SuRE/Cut Buffer B for Restriction Enzymes	Roche, Basel, Schweiz
Target Retrieval Solution	Dako, Carpinteria, Kalifornien, USA
WesternBright Chemilumineszenz Substrat Sirius	Biozym, Oldendorf, Deutschland

2.1.8.2 Selbst hergestellt

Alle Puffer wurden, wenn nicht anders beschrieben, in destilliertem Wasser angesetzt.

Tabelle 12: Selbst hergestellte Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
AEC-Substratlösung	1mM AEC, 5% DMF (v/v), 3% H ₂ O ₂ (v/v) in Natriumacetatlösung
Harnstoff-SDS- (HS-) Puffer	8 M Harnstoff, 4% SDS (w/v)
Lösung A	10 mM HEPES in HBSS, pH 7,3 (RT)
Natriumacetatlösung	0,1 M Natriumacetat, pH 5,2 (RT)
PBS-T	0,05% Tween20 (v/v) in 1× PBS
TBS mit Tween20 (TBS-T)	0,05% Tween20 (v/v) in 1× TBS
Tris-Borat-EDTA- (TBE-) Puffer	90 mM Tris, 2 mM Borsäure, 0,01 M EDTA, pH 8,0 (RT)
Tris-EDTA- (TE-) Puffer	10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5 (RT)
Tris-gepufferte Salzlösung (TBS) (10×)	1,5 M NaCl, 100 mM Trizma® base, 10 mM NaN ₃
Zitratpuffer	10 mM Zitronensäure, pH 6,0 (RT)
Zitratpuffer II	1,8 µM Zitronensäure, 8,2 µM Natriumzitat, pH 6,0 (RT)

2.1.9 Enzyme

Tabelle 13: Enzyme

Enzym	Hersteller
Restriktionsenzym HindIII	Roche, Basel, Schweiz
Restriktionsenzym XbaI	Roche, Basel, Schweiz
T4 DNA Ligase	Roche, Basel, Schweiz

2.1.10 Elektrophoresestandards

Tabelle 14: Elektrophoresestandards

Standard	Hersteller
GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Precision Plus Protein™ All Blue Prestained Protein Standards	Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA

2.1.11 Antikörper

2.1.11.1 Primäre Antikörper

Tabelle 15: Primäre Antikörper

Antigen	Zielspezies	Wirtszpezies	Verwendung	Markierung	Hersteller
CD31	Maus	Kaninchen	IF	-	Abcam, Cambridge, England
CD31	Maus	Ratte	IF	-	PharMingen, Heidelberg, Deutschland
Ki67	Mensch	Kaninchen	IF	-	Abcam, Cambridge, England
NIS	Mensch	Maus	IHC/IF	-	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
NIS	Mensch	Maus	WB	-	Abcam, Cambridge, England
SV40 large T antigen	Mensch	Maus	IHC	-	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
β-Aktin	Mensch	Maus	WB	-	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA

2.1.11.2 Sekundäre Antikörper

Tabelle 16: Sekundäre Antikörper

Antigen	Zielspezies	Wirtspezies	Verwendung	Markierung	Hersteller
IgG	Kaninchen	Esel	IF	Alexa Fluor® 488	Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pennsylvania, USA
IgG	Kaninchen	Ziege	IF	Cy TM 3	Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
IgG	Maus	Ziege	IHC	Biotin-SP (long-spacer)	Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pennsylvania, USA
IgG	Maus	Ziege	IF	FITC	Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
IgG	Maus	Ziege	WB	Wasserstoffperoxidase	Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pennsylvania, USA
IgG	Ratte	Esel	IF	Cy TM 3	Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pennsylvania, USA

2.1.12 Kits und Zubehör

Tabelle 17: Kits und Zubehör

Kit/Zubehör	Hersteller
Biotin Blocking System	Dako, Carpinteria, Kalifornien, USA
DAB Peroxidase (HRP) Substrate Kit	Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornien, USA
EndoFree® Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Venlo, Niederlande
M.O.M. TM Immunodetection Kit	Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornien, USA
QIAprep® Spin Miniprep Kit	Qiagen, Venlo, Niederlande

QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen, Venlo, Niederlande
QIAshredder™	Qiagen, Venlo, Niederlande
QuantiTect SYBR® Green PCR Kit	Qiagen, Venlo, Niederlande
Rapid DNA Ligation Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
RNeasy® Mini Kit	Qiagen, Venlo, Niederlande
SuperScript® First-Strand Synthesis System for RT-PCR	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
VECTASTAIN Elite ABC HRP Kit	Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornien, USA

2.1.13 Primer

Tabelle 18: Primer

Gen/Vektor	Spezies	Sequenz
<i>ACTB</i> (β-Aktin)	Maus	for: 5'-AAGAGCTATGAGCTGCCTGA-3' rev: 5'-TACGGATGTCAACGTCACAC-3'
<i>ACTB</i> (β-Aktin)	Mensch	for: 5'-AGAAAATCTGGCACCACACC-3' rev: 5'-TAGCACAGCCTGGATAGCAA-3'
<i>HIF1A</i> (HIF-1α)	Mensch	for: 5'-GCTTTAACTTTGCTGGCCCC-3' rev: 5'-TTCAGCGGTGGGTAAATGGAG-3'
<i>PFKP</i>	Mensch	for: 5'-GCCAGATCGATAAGGAGGCC-3' rev: 5'-GAACGAAGGTCCTCTGGTGG-3'
pGL3-Vektor	Mensch	for: 5'-CTAGCAAAATAGGCTGTCCC-3'
<i>R 18s</i>	Maus	for: 5'-CGCAGCTAGGAATAATGGAA-3' rev: 5'-TCTGATCGTCTTCGAACCTC-3'
<i>R 18s</i>	Mensch	for: 5'-CAGCCACCCGAGATTGAGCA-3' rev: 5'-TAGTAGCGACGGGCGGTGTG-3'
<i>MCT4</i> (MCT 4)	Mensch	for: 5'-GGCCGTCAGTGTCTTCTTCA-3' rev: 5'-GACCTGTCCCGTAGAGCATG-3'
<i>GLUT1</i> (GLUT-1)	Mensch	for: 5'-CTTCACTGTCGTGTCGCTGT-3' rev: 5'-TGAAGAGTTCAGCCACGATG-3'

<i>SLC5A5/NIS</i> (NIS)	Mensch	for: 5'-TGCTAAGTGGCTTCTGGGTTGT-3' rev: 5'-TTCTTGGGGCAGAAGGAGCTG-3'
<i>STC1</i> (Stanniocalcin-1)	Mensch	for: 5'-AGCTGCCCAATCACTTCTCC-3' rev: 5'-CTCATTGGTGCGTCTCCTGT-3'
<i>TSHB</i> (TSH β)	Maus	for: 5'-GGGTATTGTATGACACGGGATA-3' rev: 5'-ATTTCCACCGTTCTGTAGATGA-3'

2.1.14 Mäuse

Tabelle 19: Mäuse

Mausstamm	Beschreibung	Züchter
CD1 nu/nu	Athymische, immundefiziente Tiere	Charles River, Sulzfeld, Deutschland

2.1.15 Materialien und Reagenzien für Tierversuche

Tabelle 20: Materialien und Reagenzien für Tierversuche

Material/Reagenz	Hersteller
Aqua ad iniectabilia	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Atipamezol	Orion Pharma, Hamburg, Deutschland
BD Micro-Fine™+ Insulinspritzen	Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA
Coated VICRYL™ Nahtmaterial 5-0	Ethicon, Somerville, New Jersey, USA
Corning® Matrigel® Basement Membrane Matrix	Corning, Corning, New York, USA
Fentanyl	Albrecht, Aulendorf, Deutschland
Fine Bote Polythene Tubing	Smiths Medical, Grasbrunn, Deutschland
Flumazenil	Hexal, Holzkirchen, Deutschland
Forene® (Isofluran)	Abbott Laboratories, Chicago, Illinois, USA
Formaldehydlösung	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Injekt®-F Feindosierungsspritzen	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Ketamin Inresa	Inresa Arzneimittel, Freiburg, Deutschland

Lektin aus <i>Bandeiraea simplicifolia</i> gekoppelt mit dem VivoTag®-S 750 Fluorochrom	Synthetisiert von Annette Feuchtinger, Helmholtz Zentrum München, München, Deutschland (Mendler <i>et al.</i> , 2016)
L-Thyroxin-Natriumsalz-Pentahydrat (T4)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Medetomidin	Albrecht, Aulendorf, Deutschland
Metacam®	Boehringer Ingelheim, Ingelheim, Deutschland
Microvette® 100	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Midazolam	Hexal, Holzkirchen, Deutschland
NaCl (0,9%)	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Naloxon	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Natriumperchlorat (NaClO ₄)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
PAXgene Tissue Container	Qiagen, Venlo, Niederlande
Rompun®	Bayer, Leverkusen, Deutschland
SonoVue®	Bracco, Mailand, Italien
Ssniff® EF R/M (normales Futter)	Ssniff, Soest, Deutschland
Ssniff® EF R/M iodarm (iodarmes Futter)	Ssniff, Soest, Deutschland
Sterican® Standardkanülen	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Thyreotropin aus der bovinen Hypophyse (TSH)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Tissue Tek® O.C.T.™	OMNILAB, München, Deutschland
Tissue-Tek® Cryomold® Molds	VWR, Radnor, Pennsylvania, USA

2.1.16 Geräte

Tabelle 21: Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
CCD Kamera für die Fluoreszenzmikroskope	AxioCam MRm	Carl Zeiss, München, Deutschland
CCD Kamera für das Lichtmikroskop (IHC)	Olympus XC30	Olympus, Shinjuku, Tokio, Japan

Dokumentationssystem für Agarosegele (Transilluminator)	TFP-M/WL	Vilber Lourmat, Eberhardzell, Deutschland
Entwicklungssystem für Western Blot	Curix 60	Agfa, Mortsel, Belgien
Fluoreszenzmikroskop	Axio Imager Z1	Carl Zeiss, München, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop	Axiovert 135 TV	Carl Zeiss, München, Deutschland
Isofluranverdampfer	Isofluran Vapor	Drägerwerk, Lübeck, Deutschland
Kryotom	-	Leica, Wetzlar, Deutschland
Lichtmikroskop (IHC)	Olympus BX41	Olympus, Shinjuku, Tokio, Japan
Lichtmikroskop (Zellkultur)	Olympus IX50	Olympus, Shinjuku, Tokio, Japan
Mikrotiterplattenlesegerät	Sunrise™ Microplate Absorbance Reader	Tecan, Männedorf, Schweiz
PCR <i>Cycler</i>	GeneAmp® PCR System 2400	PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, USA
Perfusionspumpe	DOSE IT	Integra, Zizers, Schweiz
PET	Siemens Inveon P120 microPET	Siemens, München, Deutschland
Photometer	Eppendorf BioPhotometer® plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
qRT-PCR <i>Cycler</i>	Eppendorf Mastercycler ep Gradient S	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Radioaktivitätsmessgerät für Spritzen	Radionuklid-Verwaltungssystem	Comecer, Castel Bolognese, Italien
Schiebelehre	DigiMax®	Wiha Werkzeuge, Schonach, Deutschland

Sonographiegerät	Acuson Sequoia 512	Siemens, München, Deutschland
Ultramikroskop	3D-UltraMicroscope II	LaVision BioTech GmbH, Bielefeld, Deutschland
γ -Counter für Mausorgane	Packard Cobra Quantum Gamma Counter	GMI, Ramsey, Minnesota, USA
γ -Counter für Zelllysate	LB 2111 Multi Crystal Gamma Zähler	Berthold Technologies, Bad Wildbad, Deutschland
γ -Kamera	E.CAM	Siemens, München, Deutschland

2.1.17 Sonstiges

Tabelle 22: Sonstiges

Material	Bezeichnung	Hersteller
Kryocontainer	Nalgene® Mr. Frosty® Cryo 1°C Freezing Container	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Neubauer-Zählkammer	-	Brand, Wertheim, Deutschland

2.1.18 Software

Tabelle 23: Software

Software	Verwendung	Hersteller
AxioVision	Software der Fluoreszenzmikroskope	Carl Zeiss, München, Deutschland
Hermes Gold	Auswertung der γ -Kamera- Aufnahmen	Hermes Medical Solutions, Stockholm, Schweden
IBC-PRO	Software des Radioaktivitätsmessgeräts für Spritzen	Comecer, Castel Bolognese, Italien
ImageJ	Auswertung der Ki67- und CD31-Färbung	NIH, Bethesda, Maryland, USA

Inveon Acquisition Workplace	Rekonstruktion der PET-Aufnahmen	Siemens, München, Deutschland
Inveon Research Workplace	Auswertung der PET-Aufnahmen	Siemens, München, Deutschland
Magellan™	Software des Mikrotiterplattenlesegeräts	Tecan, Männedorf, Schweiz
Olympus Cell ^A	Software des Lichtmikroskops	Olympus, Shinjuku, Tokio, Japan
pDRAW32	Erstellen von Vektorkarten	Kjeld Olesen, Måløv, Dänemark
Realplex 2.2	Software des qRT-PCR <i>Cyclers</i>	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
SnapGene Viewer	Erstellen von Vektorkarten	GSL Biotech LLC, Chicago, Illinois, USA
VueBox®	Auswertung der Sonographieaufnahmen	Bracco Suisse, Genf, Schweiz

2.1.19 Internetseiten

Tabelle 24: Internetseiten

Adresse	Verwendung
http://bioinfo.ut.ee/primer3/	Entwurf von <i>Primer</i>
http://www.doseinfo-radar.com	Berechnung der Tumor-absorbierten ¹³¹ I-Dosis
http://www.ensembl.org/index.html	Datenbank mit DNA-Sequenzen
http://www.socscistatistics.com	Statistikrechner

2.2 Methoden

2.2.1 *In vitro* Experimente

2.2.1.1 Herstellung des pGL3-HIF-NIS-Vektors

2.2.1.1.1 Restriktionsverdau der Vektoren

Für die Isolierung des Luciferase (*luc*) Gens aus dem pGL3-HIF-LUC-Vektor und des *NIS* Gens aus dem pcDNA3-CMV-NIS-Vektor wurden beide Plasmide mit den Restriktionsenzymen HindIII und

XbaI verdaut. Dazu wurden 2 µg Vektor, 1 Einheit (U) HindIII, 1 U XbaI, 1 µl SuRE/Cut Buffer B for Restriction Enzymes und 7 µl Nuklease-freies Wasser gemischt und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Der Erfolg des Restriktionsverdaus wurde anhand einer elektrophoretischen Auftrennung der DNA-Fragmente auf einem Agarosegel überprüft (s. Kapitel 2.2.1.1.2).

2.2.1.1.2 Auftrennung der DNA-Fragmente über Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung der Restriktionsansätze in einzelne DNA-Fragmente erfolgte über ein 1% Agarosegel. Zur Herstellung des Gels wurden 50 ml 1× TBE-Puffer mit 0,5 g Agarose und 4 µl Ethidiumbromid gemischt. Die Restriktionsansätze wurden mit 2 µl DNA Gel Loading Dye versetzt und zusammen mit 7 µl eines DNA-Markers (GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder oder GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder) auf das Gel aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 70 V und dauerte 1 h. Anschließend wurde das Gel unter UV-Licht auf einem Transilluminator betrachtet, fotografiert und die DNA-Fragmente wurden anhand ihrer Größe identifiziert.

2.2.1.1.3 Extraktion der DNA-Fragmente aus dem Agarosegel

Zu Beginn wurde die entsprechende DNA-Bande auf dem Transilluminator mit Hilfe eines Skalpells aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Das Gelstück wurde in ein Reaktionsgefäß gegeben und gewogen. Die anschließende Extraktion der DNA aus dem Agarosegel erfolgte mit Hilfe des QIAquick® Gel Extraction Kit nach den Instruktionen des Herstellers.

2.2.1.1.4 Ligation der DNA-Fragmente

Für die Insertion der *NIS*-DNA in den pGL3-Vektor wurde das Rapid DNA Ligation Kit nach den Angaben des Herstellers verwendet.

2.2.1.1.5 Transformation der DNA-Fragmente in kompetente Bakterien

Zur Transformation der Ligationsprodukte in kompetente Bakterien wurden die Library Efficiency® DH5α™ Competent Cells verwendet. Die Ligationsprodukte wurden 1:5 in TE-Puffer verdünnt und von dieser Verdünnung wurde 1 µl (5 ng) zu 100 µl MAX Efficiency® DH5α™ Competent Cells gegeben. Es folgte eine Inkubation für 30 min auf Eis und anschließend für 45 s bei 42 °C in einem Wasserbad. Daraufhin wurden die Bakterien erneut für 2 min auf Eis inkubiert, bevor 900 µl S.O.C-Medium hinzugegeben wurde. Die Bakterien wurden anschließend für 1 h bei RT geschüttelt, in verschiedenen Verdünnungen auf Ampicillin-haltigen Agarplatten (s. Kapitel 2.2.1.1.6) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.1.1.6 Herstellung von Agarplatten

Für die Herstellung von zehn Agarplatten wurden 200 ml LB-Medium mit 3 g Select Agar® vermischt. Das Medium wurde aufgeköcht, mit 100 µl/ml Ampicillin-Natriumsalz versetzt und auf Petrischalen verteilt. Diese wurden bei 4 °C gelagert.

2.2.1.1.7 Herstellung von Glycerinstocks

Für die Herstellung von Glycerinstocks wurde 1 ml Bakteriensuspension aus einer Übernachtskultur mit 333 µl Einfriermedium gemischt. Die Glycerinstocks dienen der längerfristigen Aufbewahrung der transformierten Bakterien und wurden bei -80 °C gelagert.

2.2.1.1.8 DNA-Minipräparation

Für die DNA-Minipräparation wurde das QIAprep® Spin Miniprep Kit nach den Angaben des Herstellers verwendet.

2.2.1.1.9 Kontrollrestriktionsverdau des Vektors

Zur Kontrolle der richtigen Insertion der *NIS*-DNA in den pGL3-Vektor, wurde dieser nach der DNA-Minipräparation erneut mit den Restriktionsenzymen HindIII und XbaI geschnitten. Hierfür wurden 1 µg Vektor mit 0,5 U HindIII, 0,5 U XbaI, 1 µl SuRE/Cut Buffer B for Restriction Enzymes und 6 µl Nuklease-freiem Wasser gemischt und der Ansatz wurde für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Auftrennung der DNA-Fragmente mittels Agarosegelelektrophorese erfolgte wie in Kapitel 2.2.1.1.2 beschrieben. Der Bakterienklon, welcher nach dem Kontrollverdau die korrekten DNA-Fragmente aufwies, wurde für eine DNA-Maxipräparation hochgezogen.

2.2.1.1.10 DNA-Maxipräparation

Die DNA-Maxipräparation erfolgte, unter Verwendung des EndoFree® Plasmid Maxi Kits, gemäß den Instruktionen des Herstellers. Die DNA wurde nach der Maxipräparation in Nuklease-freiem Wasser resuspendiert.

2.2.1.1.11 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die DNA-Konzentration wurde durch Photometrie bestimmt. Dafür wurde die Probe 1:50 in Nuklease-freiem Wasser verdünnt und in einer Küvette in einem Photometer vermessen. Zur Kontrolle der Reinheit der DNA wurden zusätzlich der $A_{260/230}$ und $A_{260/280}$ Wert bestimmt.

2.2.1.1.12 DNA-Sequenzierung

Die korrekte Insertion der gewünschten DNA-Fragmente wurde, neben dem Kontrollverdau des Vektors (s. Kapitel 2.2.1.1.9), durch eine DNA-Sequenzierung nochmals überprüft. Es wurde die DNA zweier Klone getestet, welche im Kontrollverdau die richtige Größe an DNA-Banden zeigte. Von beiden Klonen wurden 15 µl DNA mit einer Konzentration zwischen 50-100 ng/µl pro *Primer* versendet. Es wurden folgende *Primer*sequenzen gewählt: pGL3 for, NIS for, NIS rev (s. Kapitel 2.1.13). Die Sequenzierung wurde von MWG/Eurofins (Ebersberg, Deutschland) durchgeführt.

2.2.1.2 Methoden im Rahmen der Zellkultur

2.2.1.2.1 Zellkultur

Die Kultivierung von Zellen erfolgte unter sterilen Bedingungen. Die Zellen wurden in einem Zellkulturinkubator bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert.

2.2.1.2.2 Passagieren von Zellen

Alle Zellen wurden bei einer Konfluenz von 70-80% passagiert. Hierfür wurden diese mit 1× PBS gewaschen, mit 1× Trypsin-EDTA-Lösung abgelöst und in ein Röhrchen mit frischem Medium überführt. Ein Teil dieser Zellen wurde in einer, mit frischem Medium befüllten, Zellkulturschale ausgesät. Die Zellen wurden entsprechend ihrer Wachstumsrate gesplittet. Das Medium wurde alle 2-3 Tage gewechselt.

Zur Selektion transfizierter Zellen wurde dem Medium das Antibiotikum Blasticidin S HCl oder Geneticin zugesetzt. Die benötigte Antibiotikumskonzentration wurde zuvor durch Toxizitätstests ermittelt (s. Kapitel 2.2.1.3.1) und beträgt für WT-MSCs und HuH7 5 µg Blasticidin/ml Medium und 0,5 mg Geneticin/ml Medium.

2.2.1.2.3 Einfrieren von Zellen

Zum Einfrieren der Zellen wurden diese ebenfalls mit 1× PBS gewaschen, mit 1× Trypsin-EDTA-Lösung abgelöst und in ein Röhrchen mit frischem Medium aufgenommen. Die Zellen wurden bei 330×g für 5 min bei RT zentrifugiert und das Pellet in Einfriermedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in Kryoröhrchen aliquotiert und diese wurden wiederum in einem Kryocontainer, welcher zuvor mit Isopropanol befüllt wurde und ein langsames Abkühlen der Zellen ermöglicht, bei -80 °C gelagert, bevor die Zellen zur langfristigen Aufbewahrung in einen Flüssigstickstoffbehälter (-196 °C) überführt wurden.

2.2.1.2.4 Auftauen von Zellen

Zum Auftauen der Zellen wurden die Kryoröhrchen aus dem Flüssigstickstoffbehälter entnommen und die Zellsuspension bei 37 °C aufgetaut. Anschließend wurde diese in ein Röhrchen mit Medium aufgenommen und, zur Entfernung des zytotoxischen DMSO, bei 330×g für 5 min bei RT zentrifugiert. Das Pellet wurde in Medium resuspendiert und die Zellen in einer Zellkulturschale mit Medium ausgesät.

2.2.1.2.5 Zellquantifizierung

Zur Bestimmung der Zellzahl, der in Suspension befindlichen Zellen, wurde eine Neubauer-Zählkammer mit der Zellsuspension befüllt und die Zellen unter dem Mikroskop gezählt. Es wurde die Anzahl an Zellen von mindestens zwei Großquadraten bestimmt. Die Gesamtzellzahl wurde anschließend wie folgt berechnet:

$$\text{Gesamtzellzahl} = \frac{\text{Anzahl der gezählten Zellen}}{\text{Anzahl der ausgezählten Großquadrate}} \times 10000 \times \text{Volumen (ml)}$$

2.2.1.3 Generierung der HIF-NIS-MSCs und der HIF-NIS-HuH7

2.2.1.3.1 Toxizitätstest

Die Blastocidin-Konzentration, bei welcher transfizierte Zellen selektiert werden können, wurde durch einen Toxizitätstest ermittelt. Dazu wurden 1×10^5 Zellen pro *Well* einer 12-*Well*-Platte ausgesät. Nach 24 h wurde dem Medium Blastocidin S HCl in steigenden Konzentrationen (0-10 µg/ml) zugesetzt. Nach weiteren 72 h wurde die Zellviabilität mit Hilfe eines Zellviabilitätstest bestimmt (s. Kapitel 2.2.1.8). Es wurde die Antibiotikums-Konzentration zur Selektion transfizierter Zellen gewählt, bei welcher 70% der nicht-transfizierten Zellen abgestorben sind.

2.2.1.3.2 Transfektion

Für die Transfektion der WT-MSCs oder HuH7 mit dem pGL3-HIF-NIS-Vektor wurden $2,5 \times 10^5$ Zellen pro *Well* einer 6-*Well*-Platte ausgesät. Nach 24 h erfolgte die Transfektion der Zellen unter Verwendung des Lipofectamine® Transfection Reagent in Kombination mit dem PLUS™ Reagent nach den Angaben des Herstellers. Nach weiteren 24 h wurden die transfizierten Zellen mit CoCl_2 (0-300 µM) stimuliert. Das CoCl_2 inaktiviert die PHDs, welche den Abbau des HIF-1α Proteins einleiten, und ermöglicht somit die Bildung des HIF-1 Komplexes, wie es unter Hypoxie der Fall ist (Yuan *et al.*, 2003). Der HIF-1 Komplex bindet an die Hypoxie-responsiven Elemente des HRP und leitet damit die NIS-Expression ein. Somit sollte nach einer erfolgreichen Transfektion und Stimulation der Zellen mit CoCl_2 eine erhöhte NIS-vermittelte ^{125}I -Aufnahme zu beobachten sein.

Die ^{125}I -Aufnahme der Zellen wurde 24 h nach der CoCl_2 Stimulation durch einen ^{125}I -Uptake Assay analysiert (s. Kapitel 2.2.1.7). Bei den transfizierten Zellen, welche für eine spätere Einzelklonselektion weiterkultiviert wurden, wurde dem Medium 24 h nach der Transfektion Blasticidin S HCl zugesetzt.

2.2.1.3.3 Einzelklonselektion

Da nach der Transfektion eine heterogene Zellpopulation vorliegt, wurden Einzelzellklone herangezogen. Hierfür wurde ein kleiner Teil der transfizierten Zellen auf eine 15 cm Petrischale, welche zuvor mit Medium befüllt wurde, ausgesät. Aus den Einzelzellen bildeten sich Klone, welche vereinzelt weiterkultiviert wurden. Dazu wurde das Medium abgenommen und die Petrischale mit $1\times$ PBS befüllt. Die Klone wurden mit Hilfe einer Pipette abgelöst und in ein, mit Medium befülltes, Well einer 24-Well-Platte überführt. Sobald die Zellen eine Konfluenz von 70-80% erreichten, wurden sie zuerst in einem Well einer 6-Well-Platte, daraufhin in einer 10 cm und schließlich in einer 15 cm Petrischale ausgesät. Sobald eine größere Anzahl an Zellen eines Klon vorhanden war, wurde dieser mit Hilfe eines ^{125}I -Uptake Assay getestet (s. Kapitel 2.2.1.7). Der Zellklon, welcher die höchste ^{125}I -Aufnahme über einen längeren Kultivierungszeitraum aufwies, wurde für alle weiteren Versuche verwendet und wird nachfolgend als HIF-NIS-MSC oder HIF-NIS-HuH7 bezeichnet.

2.2.1.4 Stimulation von Zellen mit Schilddrüsenhormonen

2.2.1.4.1 Herstellung von Hormon-reduziertem FBS (csFBS)

Für die Herstellung von Dextran-überzogener Aktivkohle wurden 25 g Aktivkohle mit 2,5 g Dextran in 1 l PBS über Nacht bei 4 °C unter Rühren inkubiert. Anschließend wurde die mit Dextran-überzogene Aktivkohle durch Filtration vom PBS getrennt und, zur Herstellung von csFBS, mit 800 ml FBS über Nacht bei 4 °C unter Rühren inkubiert. Die Dextran-überzogene Aktivkohle wurde nach der Inkubation durch zweimalige Zentrifugation und Filtration vom csFBS getrennt. Das csFBS wurde aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Die Bestimmung der T3- und T4-Konzentration im csFBS erfolgte durch das Institut für Laboratoriumsmedizin des Klinikums der Universität München (München, Deutschland). Für T3 lag die Konzentration bei $<0,2$ pg/ml und für T4 bei 0,2-0,6 ng/dl.

2.2.1.4.2 Herstellung von konditioniertem HuH7 Medium (cHuH7M)

Zur Herstellung von cHuH7M wurden $2,5\times 10^6$ HuH7 auf einer 15 cm Petrischale ausgesät. Die Zellen wurden für 48 h in 30 ml ihres Mediums kultiviert, wobei das FBS im Medium durch csFBS (M/csFBS) ersetzt wurde. Anschließend wurde das cHuH7M abgenommen und in ein Röhrchen überführt. Zur Elimination von abgestorbenen Zellen und Zelltrümmern, wurde das cHuH7M bei $330\times g$ für 5 min

bei RT zentrifugiert und der Überstand in ein neues Röhrchen aufgenommen. Das cHuH7M wurde für max. eine Woche bei 4 °C gelagert.

2.2.1.4.3 Stimulation von Zellen mit Schilddrüsenhormonen

Die Schilddrüsenhormone T3 und T4 und der Schilddrüsenhormonmetabolit Tetrac wurden in 0,1 M NaOH gelöst und mit Zellkulturmedium auf eine Konzentration von 25 µM (T3 und T4) oder 100 µM (Tetrac) verdünnt. Die Signalwegsinhibitoren RAF265 und InSolution™ LY294002 wurden in DMSO auf eine Konzentration von 10 mM verdünnt. Anschließend wurden diese aliquotiert und lichtgeschützt bei -20 °C gelagert.

Für die Stimulation der Zellen mit Schilddrüsenhormonen wurden diese zuerst für 24 h in M/csFBS in einer 10 cm Petrischale (hBMSCs) oder einer 6-Well-Platte (HIF-NIS-MSCs/HIF-NIS-HuH7) kultiviert. Daraufhin wurden die HIF-NIS-HuH7 für 24 h mit M/csFBS, die hBMSCs für 24 h mit M/csFBS und 20% cHuH7M und die HIF-NIS-MSCs für 24 h mit M/csFBS und 20% oder 100% cHuH7M stimuliert, wobei dem Medium 1 nM T3 oder 100 nM T4 (mit oder ohne 100 nM Tetrac) zugesetzt wurde. Die HIF-NIS-MSCs und die HIF-NIS-HuH7 wurden zusätzlich während der Schilddrüsenhormonstimulation für 24 h mit 50 µM CoCl₂ behandelt und ein Teil der HIF-NIS-MSCs wurde zusätzlich mit 1 µM RAF265 oder 10 µM InSolution™ LY294002 stimuliert. Die hBMSCs wurden einige Tage vor der Schilddrüsenhormonstimulation nicht mehr mit Thrombozyten kultiviert. Auch während der Stimulation wurden keine Thrombozyten verwendet. Als Kontrolle dienten Zellen, welche nicht mit T3, T4, Tetrac, RAF265 oder InSolution™ LY294002 behandelt wurden.

2.2.1.5 Vorbereitung der Zellen für die *in vivo* Applikation

Für die *in vivo* Applikation der HuH7 wurden diese mit 1× PBS gewaschen und mit 1× Trypsin-EDTA-Lösung abgelöst. Die Tumorzellen wurden in ein Röhrchen mit frischem Medium gegeben und mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Anschließend wurden diese bei 330×g für 5 min bei RT zentrifugiert und das Pellet mit PBS gewaschen. Dieser Waschschrift wurde dreimal wiederholt, bis die HuH7 schließlich in einer Konzentration von 50×10⁶ Zellen/ml für das subkutane Modell oder 40×10⁶ Zellen/ml für das orthotope Modell in PBS resuspendiert wurden.

Für die *in vivo* Injektion der MSCs wurde gleich verfahren, wie bei der Vorbereitung der HuH7, bis auf den Unterschied, dass die MSCs mit 1,5 mM EDTA abgelöst, nur zweimal mit PBS gewaschen und in einer Konzentration von 1×10⁶ Zellen/ml resuspendiert wurden.

Für die 3D-Lichtblattfluoreszenzmikroskopie wurden die MSCs, bevor diese für die intravenöse Applikation vorbereitet wurden, mit 10 µM CellTracker™ Deep Red nach den Angaben des Herstellers gefärbt.

Zum Transport in den Tierstall wurden die Zellen auf Eis gelagert.

2.2.1.6 Analyse der Genexpression

2.2.1.6.1 RNA-Extraktion

Zur Extraktion von RNA aus Zellen oder Geweben wurde der QIAshredder™ in Kombination mit dem RNeasy® Mini Kit nach der Anleitung des Herstellers verwendet.

2.2.1.6.2 cDNA-Synthese

Für die Reverse Transkription wurde das SuperScript® III First-Strand Synthesis System for RT-PCR verwendet. Die Reverse Transkription wurde wie folgt durchgeführt:

Tabelle 25: cDNA-Synthese

Reagenz	Menge
RNA	10 µl
Desoxyribonukleosidtri-phosphatmix (10 mM)	1 µl
Oligonukleotide (50 ng/µl)	2 µl
5 min auf 65 °C	
1 min auf Eis	
Reverser Transkriptionspuffer (10×)	2 µl
Magnesiumchlorid (MgCl ₂) (25 mM)	4 µl
1,4-Dithiothreitol (DTT) (0,1 M)	2 µl
RNaseOUT™ (40 U/µl)	1 µl
2 min auf 25 °C	
SuperScript III RT (200 U/µl)	1 µl
25 min auf 25 °C	
50 min auf 42 °C	
15 min auf 70 °C	

RNaseH (2 U/μl)	1 μl
20 min auf 37 °C	

Nach der Reversen Transkription wurde die cDNA-Konzentration, wie in Kapitel 2.2.1.1.11 beschrieben, bestimmt. Die cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung auf -20 °C gelagert.

2.2.1.6.3 Entwurf von *Primer*

Vor Beginn der qRT-PCR wurden für die zu analysierenden Gene *Primer* entworfen. Hierfür wurde die entsprechende DNA-Sequenz des Gens in Ensembl gesucht und die *Primer* mit Primer3 entworfen. Es wurde darauf geachtet, dass beide *Primer* eines *Primerpaares* die gleiche Schmelztemperatur aufweisen, dass das 5'- und 3'-Ende eines *Primers* und die beiden *Primer* eines *Primerpaares* keine komplementären Basenpaare aufweisen, dass die *Primer* eines *Primerpaares* an unterschiedliche Exons innerhalb eines Gens binden und das zu amplifizierende DNA-Fragment nicht zu groß wird.

2.2.1.6.4 qRT-PCR

Für die qRT-PCR wurden die cDNA-Proben auf eine Konzentration von 20 ng/μl und die *Primer* (s. Kapitel 2.1.13) auf eine Konzentration von 10 pmol/μl mit Nuklease-freiem Wasser verdünnt. Anschließend wurden 5 μl der zu messenden cDNA-Probe und 20 μl des qRT-PCR Mastermixes (siehe unten) in eine Eppendorf twin.tec® PCR Plate pipettiert. Der qRT-PCR Mastermix setzte sich für jede cDNA-Probe wie folgt zusammen:

Tabelle 26: Probenzusammensetzung für qRT-PCR

Reagenz	Menge
<i>For Primer</i>	1 μl
<i>Rev Primer</i>	1 μl
Nuklease-freies Wasser	5,5 μl
SYBR® Green	12,5 μl

Die Eppendorf twin.tec® PCR Plate wurde daraufhin durch Hitze mit einem Heat Sealing PCR Film and Foil verschlossen und in den Mastercycler ep gradient S qRT-PCR *Cycler* gegeben. Für die qRT-PCR wurde folgendes Programm gewählt:

Tabelle 27: Programm für qRT-PCR

Temperatur [°C]	Zeit	Anzahl der Wiederholungen
95 °C	15 min	1×
95 °C	15 s	45×
60 °C	1 min	
72 °C	30 s	
81 °C	20 s	
50 °C	1 min	1×
95 °C	15 s	1×
60 °C	15 s	1×
60-95 °C	20 min	1×
95 °C	15 s	1×
50 °C	1 min	1×

Die Ergebnisse der qRT-PCR wurden durch die $\Delta\Delta C_T$ -Methode ausgewertet (Livak & Schmittgen, 2001). Als interner Standard wurden die *housekeeping* Gene *R 18s* und *ACTB* verwendet und als Negativkontrolle für jedes Gen Nuklease-freies Wasser anstatt von cDNA analysiert.

2.2.1.7 ¹²⁵I-Uptake Assay

Für den ¹²⁵I-Uptake Assay wurden die Zellen mit Lösung A gewaschen und in 1 ml Lösung A versetzt mit 10 µM NaI und 0,1 µCi ¹²⁵I/ml Lösung A für 45 min bei 37 °C inkubiert. Einem Teil der *Wells* wurde zusätzlich, zur Blockierung der NIS-vermittelten ¹²⁵I-Aufnahme, 100 µM KClO₄ zugesetzt. Nach der Inkubation wurden die Zellen erneut mit Lösung A gewaschen und mit 1 M NaOH unter konstantem Schütteln lysiert. Die Radioaktivität der Zelllysate wurde durch Messung in einem γ -Counter ermittelt.

2.2.1.8 Testung der Zellviabilität

Zur Bestimmung der metabolischen Aktivität der Zellen wurde MTT im Verhältnis 1:200 zu jedem *Well* einer 6-*Well*-Platte pipettiert und die Zellen für 2 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 1× PBS gewaschen und das Formazanprodukt durch Zugabe von 1 ml 90% Isopropanol (v/v) und 10% DMSO (v/v) gelöst. Die Absorption des Formazanprodukts wurde bei 620 nm in einem Mikrotiterplattenlesegerät gemessen. Diese korreliert mit der Anzahl an lebenden Zellen.

2.2.1.9 Analyse der Proteinexpression

2.2.1.9.1 Proteinextraktion

Für die Extraktion des membranständigen NIS Proteins wurde das M-PER® Mammalian Protein Extraction Reagent in Kombination mit dem Halt™ Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail verwendet. Die MSCs wurden mit PBS von der Zellkulturplatte abgeschabt und bei 330×g für 5 min bei RT zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in 25 µl des Lysepuffers resuspendiert und der Ansatz bei 90 °C für 10 min inkubiert. Das Lysat wurde bei -20 °C gelagert.

2.2.1.9.2 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte durch einen Bio-Rad Protein Assay mit BSA als Proteinstandard. Dazu wurde das BSA mit destilliertem Wasser auf eine Konzentration von 0, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 und 1 mg/ml, die zu messenden Proben mit destilliertem Wasser 1:20 und das Protein Assay Dye Reagent Concentrate mit destilliertem Wasser 1:5 verdünnt. Es wurden jeweils 20 µl von der zu messenden Probe oder dem Proteinstandard mit 1 ml des verdünnten Färbereagens in eine Küvette gegeben, 10 min bei RT inkubiert und die optische Dichte (OD) bei 595 nm in einem Photometer gemessen. Anhand der OD₅₉₅ der Standardreihe konnte auf die Proteinkonzentration der einzelnen Proben geschlossen werden.

2.2.1.9.3 Western Blot

Für den NIS Western Blot wurden zu Beginn 60 µg der zu analysierenden Proben mit 10 µl NuPAGE® LDS Sample Buffer, 4 µl NuPAGE® Sample Reducing Agent und Nuklease-freiem Wasser zu einem Gesamtvolumen von 40 µl gemischt und für 10 min bei 70 °C denaturiert. Daraufhin wurden die Proben mit einem Precision Plus Protein™ All Blue Prestained Protein Standard auf ein NuPAGE™ Novex™ 4-12% Bis-Tris Protein Gel geladen und bei 200 V für 1 h aufgetrennt. Der Transfer der Proteine vom Polyacrylamidgel auf eine Nitrocellulose Pre-Cut Blotting Membrane erfolgte durch *electroblotting* bei 25 V für 1 h. Anschließend wurde die Membran zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen für 1 h in einer 5% Milchpulver-TBS-T Lösung (w/v) inkubiert, bevor der primäre Antikörper gerichtet gegen die extrazelluläre Domäne von NIS aus der Maus, 1:3000 verdünnt in einer 0,1% Milchpulver-TBS-T Lösung, über Nacht bei 4 °C dazugegeben wurde. Der ungebundene Antikörper wurde durch mehrmaliges Waschen mit TBS-T entfernt und anschließend wurde ein sekundärer Antikörper aus der Ziege, gekoppelt mit dem Enzym Wasserstoffperoxidase, gerichtet gegen den primären NIS Antikörper aus der Maus, 1:5000 verdünnt in einer 0,1% Milchpulver-TBS-T Lösung, für 2 h bei RT dazugegeben. Nach erneutem mehrmaligem Waschen mit TBS-T, zur Entfernung des ungebundenen Antikörpers, wurde zur Proteindetektion das WesternBright

Chemilumineszenz Substrat Sirius für 1 min dazugegeben. Daraufhin wurde die Nitrocellulose Pre-Cut Blotting Membrane für 10 s unter Verwendung eines Carestream® KODAK® BIO MAX® MR Films in einem Entwicklungssystem für Western Blots exponiert. Anhand des Proteinmarkers konnte die Größe der Proteinfragmente ermittelt werden.

Um die Antikörper wieder zu entfernen, wurde die Membran für 30 min in HS-Puffer, 3× für 10 min in 10% Trichloressigsäure (v/v) inkubiert und mehrmalig in TBS-T gewaschen. Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran erneut für 1 h in einer 5% Milchpulver-TBS-T Lösung inkubiert, bevor der primäre Antikörper gegen β -Aktin, 1:5000 verdünnt in einer 0,1% Milchpulver-TBS-T Lösung, über Nacht bei 4 °C dazugegeben wurde. Die anschließenden Schritte wurden wie oben beschrieben durchgeführt.

2.2.1.10 Zellinvasion in Sphäroide

Zur Bildung von Sphäroiden wurden HuH7 auf Zellkulturschalen ausgesät, welche zuvor mit PolyHEMA beschichtet wurden. Das PolyHEMA verhindert die Adhäsion der HuH7 an die Zellkulturschale, wodurch diese in Suspension wachsen und Sphäroide bilden. Sobald die Sphäroide eine Größe von 400-600 μm erreichten, wurden diese zusammen mit den HIF-NIS-MSCs oder WT-MSCs für 30 min bei 37 °C unter konstantem Schütteln inkubiert. Pro Sphäroid wurden $2,5 \times 10^4$ MSCs dazugegeben. Zur Elimination ungebundener MSCs, wurden die Sphäroide mit Wachstumsmedium gewaschen. Anschließend wurden diese für die Invasion der angelagerten MSCs erneut für 6 h, 24 h oder 48 h auf PolyHEMA-beschichteten Zellkulturschalen ausgesät. Nach der Anlagerung oder Invasion der MSCs in die Sphäroide wurde die Hypoxie-induzierte, NIS-vermittelte ^{125}I -Aufnahme durch einen ^{125}I -Uptake Assay analysiert (s. Kapitel 2.2.1.7).

2.2.2 In vivo Experimente

2.2.2.1 Tierhaltung

Alle Tierversuche wurden in Übereinstimmung mit den, durch die Regierung von Oberbayern, genehmigten Tierschutzanträgen durchgeführt. Für die Versuche wurden weibliche (Versuch 3.2 - 3.4) oder männliche (Versuch 3.6) CD1 nu/nu Mäuse im Alter von 5-6 Wochen von Charles River gekauft. Die Tiere wurden unter spezifischen pathogenfreien Bedingungen, in speziell dafür ausgelegten Räumlichkeiten, an der Pharmazeutischen Biologie-Biotechnologie der Fakultät für Chemie und Pharmazie der LMU München (München, Deutschland) sowie in der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin des Klinikums der Universität München (München, Deutschland) mit einem 12-Stunden Tag/Nacht-Rhythmus gehalten und hatten Futter und Wasser *ad libitum* zur Verfügung. Die Versuche wurden frühestens nach einer einwöchigen Akklimatisierung der Tiere

begonnen. Um die Tiere unterscheiden zu können, wurden Markierungslöcher in die Ohrmuscheln der Mäuse gestanzt. Bei den Tieren aus den Versuchen 3.2 - 3.4 wurde, um die Radionuklidaufnahme in der Schilddrüse zu minimieren und somit die Radionuklidaufnahme in den Tumor zu maximieren, dem Trinkwasser der Mäuse 10 Tage vor Radionuklidapplikation (^{123}I , ^{124}I , ^{18}F -TFB, ^{131}I) 5 mg/l T4 in 0,01% BSA zugesetzt. Das Trinkwasser wurde alle zwei Tage gewechselt.

2.2.2.2 Etablierung von Tumoren

2.2.2.2.1 Etablierung von subkutanen Tumoren

Subkutane HuH7 Tumoren wurden durch die Injektion von 5×10^6 HuH7 Zellen in die rechte Flanke der Maus induziert. Dazu wurden die Mäuse durch eine Person fixiert, während eine weitere Person die Haut mit einer Pinzette anhob und die Zellen, mit Hilfe einer 1 ml Spritze in Kombination mit einer 26 G Kanüle, in eine Hautfalte injizierte. Die Tumorgößen wurden regelmäßig mit Hilfe einer digitalen Schiebelehre gemessen und das Tumolvolumen durch folgende Formel bestimmt:

$$\text{Tumolvolumen} = \text{Länge} \times \text{Höhe} \times \text{Breite} \times 0,52$$

Die Mäuse wurden euthanasiert, wenn die Tumore nekrotisch wurden oder eine Größe von 1500 mm³ überschritten.

2.2.2.2.2 Etablierung von orthotopen Tumoren

Für die intrahepatische Tumorzellinjektion wurden die Mäuse durch die intraperitoneale Applikation von Midazolam (5 mg/kg Körpergewicht), Medetomidin (1 mg/kg Körpergewicht) und Fentanyl (0,05 mg/kg Körpergewicht) narkotisiert. Für die intraperitoneale Applikation wurden die Mäuse im Rollgriff gehalten. Um ein Absinken der Körpertemperatur zu verhindern, wurde die Operation auf einer Wärmematte durchgeführt. Zu Beginn wurde die Haut desinfiziert und mit einem Skalpell in der Mitte des oberen Abdomens geöffnet. Daraufhin wurden 1×10^6 HuH7, resuspendiert in 25 µl PBS und 25 µl Corning® Matrigel® Basement Membrane Matrix, mit Hilfe einer 1 ml Spritze und 30 G Kanüle, direkt in den linken Leberlappen injiziert. Um ein Auslaufen der Tumorzellen zu verhindern und die Blutung zu stillen, wurde ein Wattestäbchen vorsichtig auf die Injektionsstelle gedrückt. Anschließend wurden die Unterhaut und Oberhaut getrennt durch Coated VICRYL™ Nahtmaterial 5-0 vernäht. Die Narkose wurde durch die subkutane Injektion von Flumazenil (0,5 mg/kg Körpergewicht), Atipamezol (2,5 mg/kg Körpergewicht) und Naloxon (0,4 mg/kg Körpergewicht) antagonisiert. Um eine Entzündung zu verhindern und die Wundschmerzen zu minimieren, wurden die Mäuse vor und nach der Operation mit Metacam® (0,5 mg/kg Körpergewicht) behandelt. Falls der Blutverlust während der Operation mehr als 10% betrug oder die Maus Schmerzsymptome zeigte, wurde sie direkt euthanasiert. Die Mäuse wurden zudem

euthanasiert, sobald der Anteil an gesundem Lebergewebe weniger als 30% betrug oder die Mäuse andere Krankheitssymptome zeigten.

2.2.2.3 Bildgebende Verfahren

2.2.2.3.1 ^{123}I -Szintigraphie

Die ^{123}I -Aufnahme der subkutanen HuH7 Tumoren nach systemischer Applikation von WT-MSCs oder HIF-NIS-MSCs wurde durch ^{123}I -Szintigraphie ermittelt. Sobald die subkutanen HuH7 Tumoren eine Größe von 3-5 mm erreichten, wurden den Mäusen 3× in einem Abstand von 5 Tagen 5×10^5 MSCs in 500 µl PBS intravenös mit einer BD Micro-Fine™+ Insulinspritze über die Schwanzvene injiziert. Für die intravenöse Applikation wurden die Mäuse in einem Inokulationsröhrchen fixiert. 72 h nach der letzten MSC-Applikation wurde das ^{123}I (18,5 MBq) intraperitoneal über eine 1 ml Spritze und 26 G Kanüle injiziert und die Akkumulation und Retentionszeit des Radioiods im Tumor anhand von Gammakameramessungen ermittelt. Für dieses bildgebende Verfahren wurden die Mäuse durch eine Inhalationsnarkose mit 2% Isofluran in Sauerstoff narkotisiert und auf die Gammakamera gelegt. Die Gammakamera war mit einem *low energy high resolution* Kollimator ausgestattet. Jede Aufnahme dauerte 10 min und erfolgte 10 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 6 h und 8 h nach der ^{123}I -Injektion. Einem Teil der Mäuse wurde 30 min vor der ^{123}I -Injektion der NIS-spezifische Inhibitor NaClO_4 (2mg/Maus) verabreicht. Nach Versuchsende wurden die Tiere durch eine Überdosis Isofluran und anschließendem Genickbruch euthanasiert. Zur Probenentnahme wurden die Mäuse in Rückenlage an Vorder- und Hinterpfoten fixiert und der Bauchraum geöffnet. Es wurden Tumor, Milz, Leber, Lunge und Niere mit Hilfe eines Präparierbestecks vorsichtig entnommen. Die Organe wurden gewogen, in Tissue Tek® O.C.T.™ eingebettet, auf Trockeneis schockgefrostet und zur längerfristigen Aufbewahrung bei -80 °C gelagert. Ein Teil der Organe wurde in Formaldehydlösung fixiert.

Zur Berechnung des prozentualen Anteils der injizierten ^{123}I -Dosis pro Gramm Tumor (% ID/g) wurden, mit der Software Hermes Gold, der Tumor bzw. der Standard als *Regions of Interest* (ROIs) definiert und die ^{123}I -Aufnahme dieser Regionen quantifiziert. Die dosimetrische Berechnung wurde von Christian Zach (Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin, Klinikum der Universität München, München, Deutschland) nach dem Konzept der *Medical Internal Radiation Dose* mit einem RADAR Dosisfaktor durchgeführt. Hierbei wurde die biologische Halbwertszeit des ^{123}I im Tumor, die effektive Halbwertszeit für ^{131}I und die Tumor-absorbierte ^{131}I -Dosis in mGy/MBq/g berechnet.

2.2.2.3.2 ^{124}I -/ ^{18}F -TFB-PET

Für eine präzisere Bestimmung der MSC-Verteilung und der Hypoxie-induzierten NIS-Expression wurde die ^{124}I - bzw. ^{18}F -TFB-Akkumulation durch PET-Aufnahmen ermittelt. Die systemische MSC-Applikation erfolgte, sobald die subkutanen Tumoren eine Größe von 3-5 mm bzw. die orthotopen Tumoren eine Größe von ca. 3 mm erreichten, nach dem gleichen Schema, wie für die ^{123}I -Szintigraphie. Das ^{124}I (~10-13 MBq) wurde mittels einer 1 ml Spritze und 26 G Kanüle intraperitoneal injiziert, wohingegen das ^{18}F -TFB (~10 MBq) über einen 30 G Schwanzvenenkatheter intravenös injiziert wurde. Einem Teil der Mäuse wurde vor der Radionuklidapplikation, analog zur ^{123}I -Szintigraphie, NaClO_4 appliziert. Die Radionuklidverteilung wurde in einem microPET bestimmt. Die Bildgebung erfolgte unter Inhalationsnarkose mit 2% Isofluran in Sauerstoff 1 h, 3 h und 5 h nach ^{124}I und 30 min, 1 h und 2 h nach ^{18}F -TFB-Applikation. Nach Beendigung der PET Messung wurden die Tiere euthanasiert und die Organe, wie für die ^{123}I -Szintigraphie beschrieben, gelagert. Die Daten wurden über die Software Inveon Acquisition Workplace rekonstruiert. Die Auswertung der Daten erfolgte über die Software Inveon Research Workplace, bei welcher die Tumoren als ROIs definiert und quantifiziert wurden. Die ^{124}I -Aufnahme der Tumoren wurde als % ID/g dargestellt. Die dosimetrischen Berechnungen erfolgten, wie für die ^{123}I -Szintigraphie beschrieben, von Christian Zach (Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin, Klinikum der Universität München, München, Deutschland).

2.2.2.4 Vorbereitung der Mäuse für die 3D-Lichtblattfluoreszenzmikroskopie

Für die 3-dimensionale Analyse der Tumolvaskularisierung und MSC-Verteilung im Tumor durch 3D-Lichtblattfluoreszenzmikroskopie wurden den Mäusen intravenös über die Schwanzvene 3x in einem Abstand von 2 Tagen CellTracker™ Deep Red-markierte CMV-NIS-MSCs (5×10^5 MSCs in 500 μl PBS) appliziert. 72 h nach der letzten MSC-Injektion erfolgte die intravenöse Applikation von VivoTag®-S 750 Fluorochrom-markiertes Lektin aus *Bandeiraea simplicifolia* (3 nmol/Maus) zur Markierung der Blutgefäße. 10 min später wurden die Mäuse für die Perfusion mit einer Ketamin und Xylazin Mischung (Ketamin: 4 ml; Xylazin: 1 ml und 0,9% NaCl: 24 ml; 300-500 μl pro Maus, abhängig vom Körpergewicht) narkotisiert, sodass ein Stadium einer tiefen Sedation eintrat, bei welchem keine Lid- oder Schmerzreflexe mehr vorhanden waren. Anschließend wurde die Maus in Rückenlage mit abgespreizten Gliedmaßen fixiert, der Bauchraum geöffnet und das Herz freigelegt. Für die Perfusion wurde eine 20 G *Butterfly*kanüle, welche am Auslassschlauch einer peristaltischen Perfusionspumpe angebracht wurde, im linken Ventrikel des Herzens platziert. Für ein Herausfließen des Blutes aus der Maus wurde die Vena Cava geöffnet. Die Perfusion dauerte 7-10 min und wurde mit eiskaltem PBS und anschließend mit der Lösung 1 aus dem PAXgene Tissue Container durchgeführt. Die vollständige Entleerung des Blutkreislaufs der Tiere wurde anhand der

Farbe der Leber überprüft. Nach der Perfusion wurden die Tumoren entnommen und über Nacht in der Lösung 1 des PAXgene Tissue Containers fixiert und für 2-24 h in der Lösung 2 des PAXgene Tissue Containers stabilisiert. Das anschließende *Clearing* der Tumoren und die 3D-Lichtblattfluoreszenzmikroskopie wurden von Annette Feuchtinger (Helmholtz Zentrum München, München, Deutschland) durchgeführt (Erturk *et al.*, 2012; Feuchtinger, Walch & Dobosz, 2016; Mendler *et al.*, 2016). Für die 3D-Lichtblattfluoreszenzmikroskopie wurde das 3D-UltraMicroscope II verwendet. Daraufhin wurden die *geclearten* Organe von Annette Feuchtinger (Helmholtz Zentrum München, München, Deutschland) in Paraffinblöcke eingebettet und histologisch aufgeschnitten. Die Fluoreszenzmikroskopieabbildungen wurden von Svenja Rühland (Medizinische Klinik und Poliklinik IV, LMU München, München, Deutschland) erstellt.

2.2.2.5 ¹³¹I-Therapie

Die Therapiestudie wurde begonnen, sobald die subkutanen Tumoren eine Größe von 3-5 mm erreichten oder 2 Wochen nach der intrahepatischen Tumorzellinjektion. Es wurden folgende Gruppen etabliert: HIF-NIS-MSC + ¹³¹I (Therapiegruppe), HIF-NIS-MSC + NaCl (Kontrollgruppe) und WT-MSC + ¹³¹I (Kontrollgruppe). Der Therapiezyklus war wie folgt aufgebaut: Die Mäuse erhielten 3× alle zwei Tage intravenöse MSC-Injektionen (5×10⁵ MSCs in 500 µl PBS), gefolgt von einer ¹³¹I- (55,5 MBq) bzw. NaCl-Applikation 48 h später. Dieser Zyklus wurde wiederholt, gefolgt von einer letzten MSC-Injektion 24 h später und einer letzten ¹³¹I- bzw. NaCl-Applikation nach weiteren 48 h. Das Therapieansprechen wurde durch Überprüfung des Tumolvolumens und Mausüberlebens ermittelt. Die Tumorgößen der subkutanen Tumoren wurden mit Hilfe einer elektronischen Schiebelehre ermittelt und die Tumorgöße der orthotopen Tumoren durch Kontrastmittel-unterstützten Ultraschall (CEUS) bestimmt. Nach Beendigung der Therapie wurden die Tumoren entnommen und, wie für die ¹²³I-Szintigraphie beschrieben, gelagert.

2.2.2.6 CEUS

CEUS wurde zur Überwachung des Tumorwachstums und zur Bestimmung der Tumorperfusion der orthotopen Tumoren durchgeführt. Die Mäuse wurden über eine Inhalationsnarkose mit 2% Isofluran in Sauerstoff auf einer Wärmematte narkotisiert. Die Analysen erfolgten in zwei Schritten unter Verwendung der *Cadence™ Contrast Pulse Sequencing Technology* (CPS). Zu Beginn wurde der Tumor im *brightness mode* in longitudinaler und transversaler Richtung dargestellt, um dessen Morphologie betrachten und das Tumolvolumen ermitteln zu können. Zur Bestimmung des Tumolvolumens wurde von jeder Dimension die Schicht mit der maximalen Länge ermittelt und diese anschließend mit Hilfe einer elektronischen Schiebelehre vermessen. Das Tumolvolumen wurde anhand folgender Formel ermittelt:

$$\text{Tumolvolumen} = \text{Länge} \times \text{Höhe} \times \text{Breite} \times 0,52$$

Im Anschluss wurde den Mäusen 100 µl des Kontrastmittels SonoVue® intravenös über einen 30G Schwanzvenenkatheter appliziert. Die Perfusion des Kontrastmittels wurde bis zu 1 min nach der Applikation mit einer Bildfrequenz von 8-10 Hz gemessen und durch Videoaufnahmen dokumentiert. Die Videoaufnahmen wurden in einem *Digital Imaging and Communication in Medicine* Format exportiert und mit Hilfe des Programms VueBox® analysiert. Für die Analysen wurde ein Modell für eine einmalige intravenöse Bolusgabe verwendet. Die Kontrastmittelkonzentration im Tumor und die Perfusions-bezogenen Parameter *peak enhancement* (PE), *wash-in area under the curve* (WiAUC), *wash-in rate* (WiR) und *wash-in perfusion index* (WiPI) wurden anhand von bereits definierten Kalibrierungskurven errechnet, nachdem die Tumoren als ROIs definiert wurden. Die CEUS-Aufnahmen und -Auswertungen erfolgten in Zusammenarbeit mit Dirk-André Clevert und Michael Ingrisch (Institut für klinische Radiologie, Klinikum der Universität München, München, Deutschland).

2.2.2.7 Schilddrüsenablation

Für die Ablation der Mausschilddrüse erhielten die Tiere zu Beginn eine Woche lang iodarmes Futter (LID), um eine möglichst hohe Radioiodaufnahme in die Schilddrüsen zu erzielen (normales Futter: 2,2 mg Iodid/kg und iodarmes Futter: <15 µg Iodid/kg). Anschließend wurde den Mäusen entweder 18,5 MBq ¹³¹I, nach einem Protokoll von Gorbman (Gorbman, 1947), oder 10 mU bovines TSH und 2 h später 5,5 MBq ¹³¹I, nach einem Protokoll von Abel *et al.* (Abel *et al.*, 1999) und Barca-Mayo *et al.* (Barca-Mayo *et al.*, 2011), intraperitoneal appliziert. Die Kontrolltiere erhielten eine intraperitoneale NaCl-Applikation anstelle einer intraperitonealen ¹³¹I-Injektion.

2.2.2.8 Blutentnahme

Für die Blutentnahme aus der Schwanzvene wurden die Mäuse zuerst auf einer Wärmematte erwärmt und anschließend in einem Inokulationsröhrchen fixiert. Die Schwanzvene wurde mit einer 26 G Kanüle punktiert und das ausfließende Blut mit Hilfe einer Microvette® 100 gesammelt. Das Blut wurde zur Gerinnung für 30 min auf Eis gelagert und anschließend für 10 min bei 10000×g zentrifugiert. Das Serum wurde abgenommen und bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C als Serumpool einer Gruppe gelagert. Die Bestimmung der T4-Konzentration im Serum erfolgte durch Eddy Rijntjes (Institut für Experimentelle Endokrinologie, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Berlin Deutschland), wie von Schmohl *et al.* (Schmohl, Mueller, Schwenk, *et al.*, 2015) beschrieben.

2.2.2.9 ^{99m}Tc -Pertechnetat-Szintigraphie

Die ^{99m}Tc -Pertechnetat-Szintigraphie wurde zur Detektion von Schilddrüsenrestgewebe nach der Schilddrüsenablation durchgeführt. Hierfür wurde den Mäusen 10 Wochen nach der Ablation 18,5 MBq ^{99m}Tc -Pertechnetat intraperitoneal appliziert und die ^{99m}Tc -Pertechnetat-Aufnahme der Schilddrüse anschließend durch eine ^{99m}Tc -Pertechnetat-Szintigraphie ermittelt. Die ^{99m}Tc -Pertechnetat-Szintigraphie erfolgte auf die gleiche Weise, wie die ^{123}I -Szintigraphie, mit der Ausnahme, dass die Radionuklidaufnahme lediglich nach 2 h gemessen wurde. Die Auswertung der ^{99m}Tc -Pertechnetat-Aufnahme in der Halsregion erfolgte, wie für die ^{123}I -Szintigraphie beschrieben. Die Ergebnisse wurden als % ID/Organ dargestellt. Nach Versuchsende wurden die Tiere auf die gleiche Weise, wie für die ^{123}I -Szintigraphie, euthanasiert und die Hypophyse und das Finalblut für weitere Analysen entnommen. Zur Entnahme des Finalbluts wurde das Herz mit einer 26 G Kanüle punktiert und das ausfließende Blut mit einer 1 ml Spritze gesammelt. Die weitere Aufarbeitung des Blutes erfolgte wie in Kapitel 2.2.2.8 beschrieben. Die Hypophyse wurde bis zur weiteren Verarbeitung in einem Röhrchen bei -80°C gelagert.

2.2.3 *Ex vivo* Experimente

2.2.3.1 *Ex vivo* ^{123}I -Biodistributionsanalyse

Die organspezifische ^{123}I -Verteilung wurde durch Messungen in einem γ -Counter bestimmt. Den Mäusen wurden hierfür WT-MSCs oder HIF-NIS-MSCs nach dem gleichen Schema, wie für die ^{123}I -Szintigraphie oder das $^{124}\text{I}/^{18}\text{F}$ -TFB-PET Imaging, appliziert. 4 h nach der ^{123}I -Applikation (18,5 MBq) wurden die Tiere euthanasiert und Tumor, Herz, Leber, Lunge, Niere, Milz, Teile der Haut, Teile der Muskeln, Blut und Teile des Darms entnommen und in γ -Counter-Röhrchen gegeben. Einem Teil der Tiere wurde vor der ^{123}I -Applikation NaClO_4 injiziert. Die Organe wurden für 48 h bei 4°C gelagert, bevor die ^{123}I -Akkumulation mit Hilfe eines γ -Counters bestimmt wurde. Die ^{123}I -Aufnahme der einzelnen Organe wurde als % ID/g dargestellt.

2.2.3.2 Anfertigung von Gefrierschnitten

Zur Anfertigung von Gefrierschnitten wurden die in Tissue Tek® O.C.T.™ eingebetteten und bei -80°C gelagerten Organe mit Hilfe eines Kryotoms in $\sim 6\ \mu\text{m}$ dicke Schichten geschnitten und auf einen Objektträger aufgezogen. Die Schnitte wurden anschließend getrocknet und bei -80°C gelagert.

2.2.3.3 Anfertigung von Paraffinschnitten

Die Einbettung der Mausorgane in Paraffinblöcke und die Anfertigung der Paraffinschnitte erfolgte durch das Institut für Pathologie der LMU München (München, Deutschland).

2.2.3.4 Immunhistochemische Färbungen

2.2.3.4.1 Hämatoxylin-Eosin- (HE-) Färbung

Die HE-Färbung der orthotopen Tumoren wurde von Annette Feuchtinger (Helmholtz Zentrum München, München, Deutschland) durchgeführt.

2.2.3.4.2 NIS-Färbung

Für die NIS-Färbung der Paraffinschnitte wurden diese zu Beginn deparaffinisiert, indem sie für jeweils 5 min in Xylol, Xylol mit Iod und für jeweils 2 min in 100% Ethanol (v/v) und 95% Ethanol (v/v) gegeben wurden. Daraufhin folgte die Blockierung der endogenen Peroxidasen durch eine Inkubation der Schnitte in 3% H₂O₂ (v/v) in Methanol für 10 min bei RT. Nachdem die Schnitte in Leitungswasser gespült wurden, wurden diese für 30 min in einem, mit Zitratpuffer gefüllten, Dampfgerat bedampft. Daraufhin wurden diese erneut mit Leitungswasser gespült und zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen für 30 min in 5% Ziegen Serum in PBS-T (v/v) inkubiert. Anschließend wurde der primäre Antikörper gegen humanes NIS aus der Maus, 1:500 verdünnt in 1% Ziegen Serum in PBS-T (v/v), für 1 h bei RT auf die Schnitte gegeben. Zur Entfernung des ungebundenen Antikörpers wurden die Schnitte mit destilliertem Wasser und PBS-T gespült. Der biotinylierte sekundäre Antikörper aus der Ziege, gerichtet gegen den primären NIS Antikörper aus der Maus, wurde 1:200 in 1% Ziegen Serum in PBS-T (v/v) verdünnt und für 20 min auf die Schnitte gegeben. Nach einem erneuten Spülen der Schnitte mit destilliertem Wasser und PBS-T wurde das 1:300 in 1% Ziegen Serum in PBS-T verdünnte, mit der Peroxidase-konjugierte Streptavidin für 20 min dazugegeben. Nach der Inkubation wurden die Schnitte erneut mit destilliertem Wasser, PBS-T und schließlich wieder mit destilliertem Wasser gespült. Für die Farbreaktion wurden die Schnitte zuerst für 2 min in einer Natriumacetatlösung und anschließend für 15 min in einer AEC-Substratlösung inkubiert. Nach erneutem Waschen der Schnitte in Leitungswasser wurden diese für 2 min in eine Hämatoxylinlösung gegeben und 10 min unter fließendem Leitungswasser gebläut. Nach dem Trocknen der Schnitte wurden diese mit Glycergel® Mounting Medium und einem Deckgläschen versehen.

Zur NIS-Färbung von Kryoschnitten wurden die Deparaffinisierungsschritte durch eine Fixierung des Gewebes mit 80% Methanol (v/v) für 5 min bei 4 °C und mit 100% Aceton (v/v) für 2 min bei -20 °C ersetzt. Nach der Blockierung der endogenen Peroxidasen wurden die Schnitte nicht mit Zitratpuffer bedampft, sondern die unspezifischen Bindungsstellen direkt blockiert. Die restlichen Schritte waren identisch zur Färbung von Paraffinschnitten.

Die Färbungen wurden durch ein Olympus BX41 Lichtmikroskop betrachtet und mit Hilfe einer Olympus XC30 CCD Kamera in Kombination mit der Olympus Cell^A Software aufgenommen.

2.2.3.4.3 SV40 large T antigen-Färbung

Für die *SV40 large T antigen*-Färbung der Paraffinschnitte wurden diese zur Deparaffinisierung für 30 min in Xylol und für jeweils 5 min in 100% Ethanol (v/v), 96% Ethanol (v/v), 70% Ethanol (v/v) und in destilliertes Wasser gegeben. Anschließend wurden die endogenen Peroxidasen durch eine Inkubation der Schnitte in 3% H₂O₂ (v/v) in PBS für 10 min blockiert. Nach dem Waschen der Schnitte in destilliertem Wasser wurden diese für 30 min in einer Target Retrieval Solution auf 95 °C erhitzt und für 20 min wieder auf RT runtergekühlt. Daraufhin wurden die Schnitte in TBS gewaschen und für 10 min zuerst in einer Avidinlösung und anschließend in einer Biotinlösung aus dem Biotin Blocking System inkubiert. Die Schnitte wurden dann erneut in TBS gewaschen und für 1 h in ein M.O.M.TM Blocking Reagent aus dem M.O.M.TM Immunodetection Kit gegeben. Nach erneutem Waschen der Schnitte in TBS wurden diese für 5 min in dem M.O.M.TM Protein Concentrate aus dem M.O.M.TM Immunodetection Kit inkubiert. Dieses wurde nach der Inkubation von den Schnitten entfernt und die Schnitte wurden anschließend mit dem primären *SV40 large T antigen* Antikörper aus der Maus, 1:1000 verdünnt in M.O.M.TM Diluent aus dem M.O.M.TM Immunodetection Kit, für 1 h bei RT inkubiert. Zur Entfernung des ungebundenen Antikörpers wurden die Schnitte in TBS gewaschen, bevor der biotinylierte sekundäre Antikörper aus dem Pferd gegen den primären *SV40 large T antigen* Antikörper aus der Maus, 1:250 verdünnt in M.O.M.TM Diluent aus dem M.O.M.TM Immunodetection Kit, dazugegeben wurde. Zur Entfernung des ungebundenen Sekundärantikörpers wurden die Schnitte erneut in TBS gewaschen, bevor diese für 30 min mit dem ABC Reagenz aus dem VECTASTAIN Elite ABC HRP Kit inkubiert wurden. Daraufhin wurden diese erneut in TBS gewaschen und in der Färbelösung des DAB Peroxidase (HRP) Substrate Kit für 5 min inkubiert. Die Schnitte wurden anschließend in destilliertem Wasser gewaschen und für 1-2 min in einer Malachitgrünlösung gefärbt. Nach erneutem Waschen der Schnitte in destilliertem Wasser wurden diese getrocknet und mit Glycergel[®] Mounting Medium und einem Deckgläschen versehen. Die Färbungen wurden auf gleiche Weise, wie die NIS-Färbungen, mikroskopiert.

2.2.3.5 Immunfluoreszenzfärbungen

2.2.3.5.1 NIS- und CD31-Färbung

Die NIS- und CD31-Färbung erfolgte von Svenja Rühland (Medizinische Klinik und Poliklinik IV, LMU München, München, Deutschland) auf Paraffinschnitten. Zu Beginn wurden die Schnitte für 1 h auf 60°C erwärmt, bevor diese für 5-20 min in Xylol, für 5-10 min nochmals in Xylol, für 5-10 min in

Isopropanol und jeweils 3-5 min in 100% Ethanol (v/v), 90% Ethanol (v/v) und 70% Ethanol (v/v) gegeben wurden. Daraufhin wurden die Schnitte für 5 min in destilliertes Wasser gegeben und anschließend für 20 min in Zitratpuffer II bei 350 W in einer Mikrowelle bedampft. Als nächstes wurden die Schnitte in TBS gespült und der primäre Antikörper gegen humanes NIS aus der Maus, 1:750 verdünnt in 4% BSA in PBS (w/v), sowie der primäre Antikörper gegen murines CD31 aus dem Kaninchen, 1:50 verdünnt in 4% BSA in PBS (w/v), über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer auf die Schnitte gegeben. Nach erneutem Spülen der Schnitte in TBS bei 37°C, wurden die Sekundärantikörper dazugegeben. Der Sekundärantikörper zur NIS-Färbung war mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC gekoppelt und wurde 1:20 eingesetzt, wohingegen der Sekundärantikörper zur CD31-Färbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff CyTM3 gekoppelt war und 1:100 appliziert wurde. Die Sekundärantikörper wurden in 4% BSA in PBS verdünnt und für 30 min bei RT zu den Schnitten gegeben. Daraufhin wurden die Schnitte erneut mit TBS bei 37°C gespült und die Hoechst 33258 Lösung wurde für 1 min bei RT dazugegeben. Die Schnitte wurden anschließend mit destilliertem Wasser gespült und nach Einbettung in VECTASHIELD® Mounting Medium und Applikation eines Deckgläschens kurzfristig bei 4 °C gelagert. Die Färbungen wurden durch ein Axio Imager Z1 Fluoreszenzmikroskop betrachtet und mit Hilfe einer AxioCam MRm CCD Kamera in Kombination mit der AxioVision Software aufgenommen.

2.2.3.5.2 Ki67- und CD31-Färbung

Die Quantifizierung der Zellproliferation und der Blutgefäßdichte im Tumor erfolgte anhand einer Ki67- und CD31-Färbung. Vor Beginn der Färbung wurden die Kryoschnitte der Tumoren für 30 min bei RT getrocknet. Zur Fixierung wurden diese für 5 min in 80% Methanol (v/v) bei 4 °C und anschließend für 2 min in 100% Aceton (v/v) bei -20 °C inkubiert. Anschließend wurden freie Bindungsstellen mit 12% BSA in PBS (w/v) für 30 min bei RT blockiert, bevor der primäre Antikörper gegen humanes Ki67 aus dem Kaninchen und der primäre Antikörper gegen murines CD31 aus der Ratte auf die Schnitte gegeben wurden. Beide Antikörper wurden in einem Verhältnis von 1:200 eingesetzt und in 4% BSA in PBS verdünnt. Nach 2 h wurden die Schnitte mit PBS gespült und der Sekundärantikörper zusammen mit der Hoechst 33258 Lösung appliziert. Der Sekundärantikörper zur Ki67-Färbung war mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor® 488 und der Sekundärantikörper zur CD31-Färbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff CyTM3 gekoppelt. Die Sekundärantikörper wurden 1:400 und die Hoechst 33258 Lösung 1:2000 in 4% BSA in PBS verdünnt eingesetzt. Die Schnitte wurden 30 min bei RT inkubiert und daraufhin mit PBS und destilliertem Wasser gespült. Nach Einbettung der noch feuchten Schnitte in Fluorescence Mounting Medium und Applikation eines Deckgläschens wurden diese kurzfristig bei 4 °C gelagert. Die Färbungen wurden durch ein Axiovert 135 TV Fluoreszenzmikroskop betrachtet und mit Hilfe einer AxioCam MRm CCD Kamera in

Kombination mit der AxioVision Software aufgenommen. Von jedem Tumor wurden 4-5 Aufnahmen gemacht. Alle Aufnahmen erfolgten unter gleichen Softwareeinstellungen. Die Quantifizierung der Ki67-positiven Zellen im Tumor und der CD31-positiven Fläche im Tumor erfolgte mit Hilfe der Software ImageJ.

2.2.4 Statistische Analysen

Alle Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM) oder % für den Kaplan-Maier Plot dargestellt. Die statistische Signifikanz der Ergebnisse wurde anhand des Student's t-Tests bzw. Mann-Whitney U Tests für Überlebens- und Gewichtskurven ermittelt. p Werte $<0,05$ wurden als signifikant betrachtet (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$; # $p<0,05$; ## $p<0,01$; ### $p<0,001$).

3 Ergebnisse

3.1 *In vitro* Charakterisierung der HIF-NIS-MSCs

Mit dem Ziel, das Potenzial einer MSC-vermittelten, Hypoxie-induzierten, NIS-basierten Radioiodtherapie zur Behandlung von Leberkarzinomen zu evaluieren, wurde zu Beginn der Arbeit ein Vektor generiert, welcher das humane *NIS* Gen unter Kontrolle eines HRP's exprimiert (pGL3-HIF-NIS). Der HRP besteht aus sechs Hypoxie-responsiven Elementen und einem minimalen Thymidinkinase Promoter. Zur Selektion transfizierter MSCs enthält der Vektor zusätzlich noch ein, durch den konstitutiv aktiven CMV Promoter kontrolliertes, Blastizidinresistenzgen (Abb. 6).

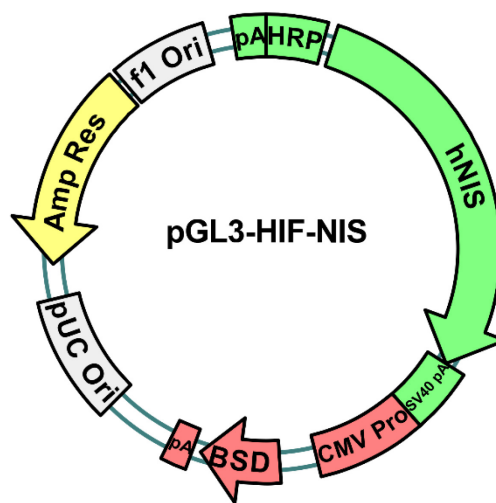


Abb. 6: Schematische Darstellung des pGL3-HIF-NIS-Vektors. Der pGL3-HIF-NIS-Vektor enthält einen HRP, welcher die NIS-Expression kontrolliert. Dieser besteht aus sechs Hypoxie-responsiven Elementen und einem minimalen Thymidinkinase Promoter. Um transfizierte MSCs selektieren zu können, enthält der Vektor zusätzlich ein BSD-Resistenzgen, welches durch den konstitutiv aktiven CMV Promoter kontrolliert wird. hNIS, humanes *NIS* Gen; HRP, Hypoxie-induzierbarer Promoter; CMV Pro, CMV Promoter; BSD, Blastizidin.

Der pGL3-HIF-NIS-Vektor wurde anschließend in WT-MSCs transfiziert. Die Verwendung von *SV40 large T antigen* immortalisierten MSCs ermöglicht die Generierung einer hohen Anzahl an Zellen eines Zellklons, wie es für die nachfolgenden Studien erforderlich ist, ohne, dass die MSCs altern oder deren Differenzierungsfähigkeit eingeschränkt ist (Gong *et al.*, 2011). Die Induzierbarkeit dieses Promoters durch Hypoxie wurde, nach einer 24 h Stimulation der MSCs mit 300 μ M CoCl_2 , durch Analyse der NIS-Expression auf Proteinebene über einen Western Blot überprüft. Für eine spezifische Detektion des NIS Proteins wurde ein Antikörper verwendet, welcher an den Carboxy-Terminus von NIS bindet und im Western Blot zu einer 80-90 kDa großen Bande führt. Eine Stimulation der HIF-NIS-MSCs mit 300 μ M CoCl_2 induzierte eine verstärkte NIS-Expression, im Vergleich zu unstimulierten HIF-NIS-MSCs (Abb. 7).

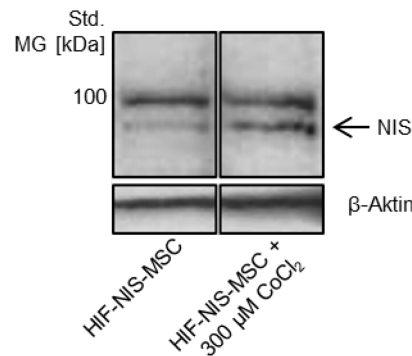


Abb. 7: NIS-Expression in HIF-NIS-MSCs nach CoCl_2 Stimulation. Eine Stimulation der HIF-NIS-MSCs mit $300 \mu\text{M}$ CoCl_2 führte zu einer erhöhten NIS-Expression, im Vergleich zu unstimulierten HIF-NIS-MSCs, welche durch eine verstärkte 80-90 kDa große Bande im Western Blot detektiert wurde. MG, Molekulargewicht; Std, Standard; kDa, Kilodalton.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass unter hypoxischen Bedingungen eine erhöhte NIS-Expression erzielt werden kann, wurde die Induzierbarkeit des HRP in einem funktionalen Versuch, durch die Analyse der NIS-vermittelten ^{125}I -Aufnahme in WT-MSCs, unstimulierten HIF-NIS-MSCs und in HIF-NIS-MSCs, welche für 24 h mit $300 \mu\text{M}$ CoCl_2 stimuliert wurden, überprüft. WT-MSCs und unstimulierte HIF-NIS-MSCs zeigten keine ^{125}I -Aufnahme über das Hintergrundsignal hinaus, wohingegen eine Stimulation der HIF-NIS-MSCs mit $300 \mu\text{M}$ CoCl_2 zu einer signifikanten Zunahme der ^{125}I -Aufnahme führte. Die ^{125}I -Aufnahme von stimulierten HIF-NIS-MSCs war um das 31-fache höher, im Vergleich zu unstimulierten HIF-NIS-MSCs. Um zu verifizieren, dass die ^{125}I -Aufnahme der stimulierten HIF-NIS-MSCs NIS-vermittelt ist, wurde ein Teil der MSCs mit dem NIS-spezifischen Inhibitor Perchlorat behandelt. Hierdurch konnte die ^{125}I -Aufnahme der stimulierten HIF-NIS-MSCs inhibiert werden (Abb. 8).

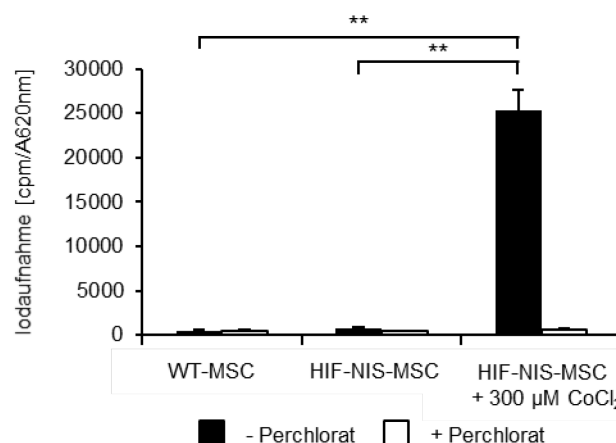


Abb. 8: NIS-vermittelte ^{125}I -Aufnahme in HIF-NIS-MSCs nach CoCl_2 Stimulation. Eine Stimulation der HIF-NIS-MSCs mit $300 \mu\text{M}$ CoCl_2 führte zu einer 31-fach höheren, NIS-vermittelten ^{125}I -Aufnahme, im Vergleich zu unstimulierten HIF-NIS-MSCs. Die NIS-vermittelte ^{125}I -Aufnahme konnte durch den NIS-spezifischen Inhibitor Perchlorat blockiert werden. Die WT-MSCs und die unstimulierten HIF-NIS-MSCs zeigten keine ^{125}I -Aufnahme

über das Hintergrundsignal hinaus. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte und Standardfehler aus drei Wiederholungen dargestellt (** $p < 0,01$).

In einem weiteren funktionalen Versuch wurde die Induzierbarkeit des HRP's nach der Einwanderung der HIF-NIS-MSCs in 3-dimensionale HuH7 Sphäroide, durch die Analyse der NIS-vermittelten ^{125}I -Aufnahme nach der Invasion, ermittelt. HuH7 Sphäroide zeigen einen Hypoxiegradient, welcher sich nach nur wenigen Zellschichten bildet und im Zentrum des Sphäroids maximal ist, wodurch sie den Zustand in einem Tumor widerspiegeln können. Nach der Invasion der WT-MSCs für 24 h oder 48 h in das hypoxische Zentrum der HuH7 Sphäroide konnte keine NIS-vermittelte ^{125}I -Aufnahme über das Hintergrundsignal hinaus beobachtet werden. Auch HIF-NIS-MSCs, die direkt nach Zellanheftung vermessen wurden, sowie MSCs, die nach 6 h Invasion vermessen wurden, zeigten keine spezifische NIS-vermittelte ^{125}I -Aufnahme. Eine Invasion der HIF-NIS-MSCs für 24 h oder 48 h in das hypoxische Zentrum der HuH7 Sphäroide hingegen führte zu einer Perchlorat-abhängigen, NIS-spezifischen ^{125}I -Aufnahme, welche nach 24 h Invasion 7,3-fach und nach 48 h Invasion 8,5-fach höher, im Vergleich zu WT-MSCs nach 24 h Invasion, war (Abb. 9).

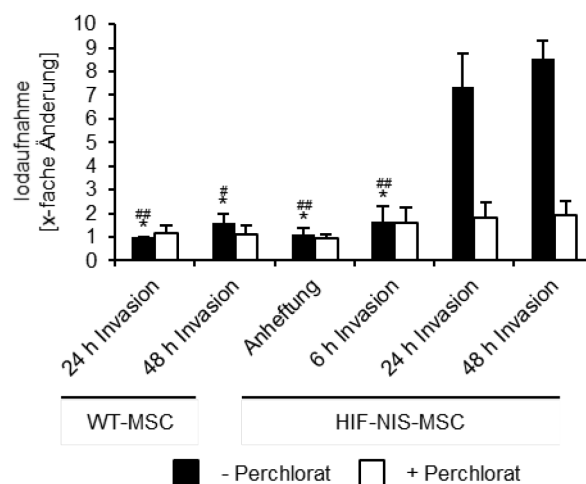


Abb. 9: Hypoxie-induzierte, NIS-vermittelte ^{125}I -Aufnahme in HIF-NIS-MSCs nach Invasion in das hypoxische Zentrum von HuH7 Sphäroiden. Eine Invasion von HIF-NIS-MSCs in das hypoxische Zentrum von HuH7 Sphäroiden induzierte eine 7,3-fach höhere, Perchlorat-abhängige, NIS-vermittelte ^{125}I -Aufnahme nach 24 h und eine 8,5-fach höhere, Perchlorat-abhängige, NIS-vermittelte ^{125}I -Aufnahme nach 48 h, im Vergleich zu WT-MSCs nach 24 h Invasion. Sowohl eine Invasion der WT-MSCs für 24 h oder 48 h in das hypoxische Zentrum als auch eine Anheftung der HIF-NIS-MSCs oder eine 6 h Invasion der HIF-NIS-MSCs in HuH7 Sphäroide führte zu keiner spezifischen ^{125}I -Aufnahme. Die Ergebnisse sind als durchschnittliche x-fache Änderung und Standardfehler, bezogen auf WT-MSCs nach 24 h Invasion, aus drei bis fünf Wiederholungen dargestellt (* $p < 0,05$; Signifikanz bezogen auf HIF-NIS-MSCs nach 24 h Invasion; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; Signifikanz bezogen auf HIF-NIS-MSCs nach 48 h Invasion).

3.2 Analyse der Hypoxie-induzierten NIS-Expression in einem subkutanen HuH7 Xenograftmausmodell

Nach der Charakterisierung der HIF-NIS-MSCs *in vitro*, wurde die MSC-Verteilung und die Hypoxie-induzierte NIS-Expression *in vivo* in Mäusen mit subkutanen HuH7 Tumoren untersucht. Hierfür wurden die WT-MSCs oder die HIF-NIS-MSCs dreimalig in einem Abstand von fünf Tagen intravenös über die Schwanzvene in Tumor-tragende Mäuse appliziert. 72 h nach der letzten MSC-Injektion erfolgte eine intraperitoneale Gabe von ^{123}I und die Verteilung des Radionuklids wurde durch eine 2-dimensionale ^{123}I -Szintigraphie ermittelt. Mäuse, welchen die HIF-NIS-MSCs injiziert wurden, zeigten 1 h nach Radioiodapplikation eine NIS-vermittelte ^{123}I -Aufnahme von $3,9 \pm 0,4\%$ ID/g im Tumor mit einer biologischen Halbwertszeit von 3,8 h (Abb. 10 A, D). Durch dosimetrische Berechnungen konnte eine Tumor-absorbierte Dosis von 26,5 mGy/MBq/g Tumor an ^{131}I mit einer effektiven Halbwertszeit von 3,8 h ermittelt werden. Mäuse, welchen WT-MSCs appliziert wurden, zeigten keine tumorale ^{123}I -Akkumulation über das Hintergrundsignal hinaus (Abb. 10 C). Die Radioiodaufnahme in der Schilddrüse, Speicheldrüse und im Magen ist auf eine endogene NIS-Expression in diesen Organen zurückzuführen, wohingegen die Radioiodakkumulation in der Blase auf der renalen Ausscheidung des Radioiods beruht (Abb. 10 A-C). Um zu belegen, dass die ^{123}I -Aufnahme im Tumor nach Gabe der HIF-NIS-MSCs auch wirklich NIS-vermittelt ist, wurde einem Teil der Mäuse der NIS-spezifische Inhibitor Perchlorat 30 min vor der ^{123}I -Injektion appliziert. Dies führte zu einer stark verminderten ^{123}I -Akkumulation im Tumor und in den physiologisch NIS-exprimierenden Organen Magen, Schilddrüse und Speicheldrüse (Abb. 10 B).

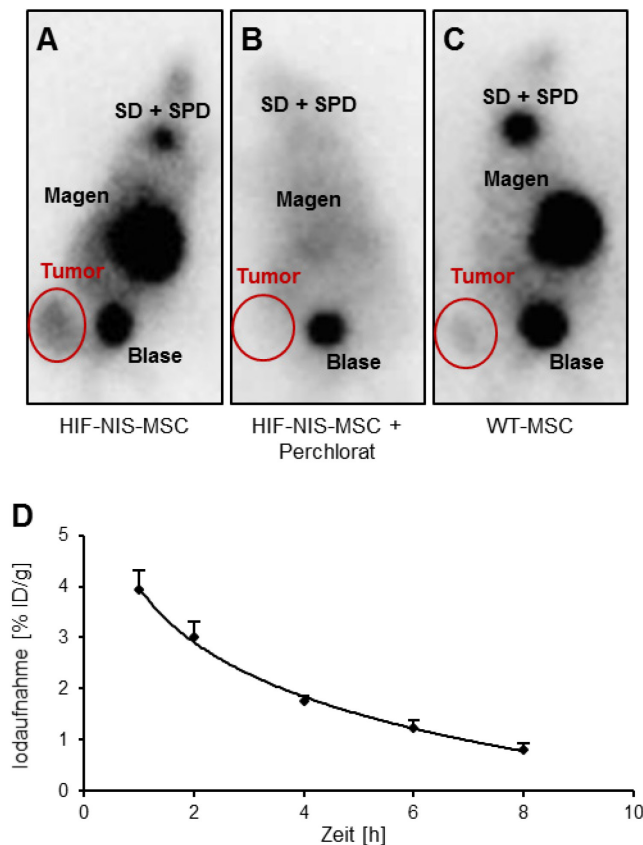


Abb. 10: Hypoxie-induzierte, NIS-vermittelte ^{123}I -Aufnahme im Tumor nach intravenöser Applikation der HIF-NIS-MSCs in ein subkutanes HuH7 Xenograftmausmodell. Die ^{123}I -Szintigraphie zeigte eine erhöhte ^{123}I -Aufnahme im Tumor 3 h nach Applikation des Radionuklids in HIF-NIS-MSC-behandelten Mäusen (A; n = 12), welche durch den NIS-spezifischen Inhibitor Perchlorat blockiert werden konnte (B; n = 4). Die intravenöse Injektion von WT-MSCs führte zu keiner spezifischen ^{123}I -Aufnahme im Tumor (C; n = 9). Dargestellt ist eine repräsentative ^{123}I -Szintigraphie-Aufnahme pro Gruppe. Durch die zeitliche Analyse der ^{123}I -Aufnahme im Tumor nach Applikation der HIF-NIS-MSCs, konnte eine maximale ^{123}I -Aufnahme von $3,9 \pm 0,4\%$ ID/g 1 h nach Radioiodapplikation mit einer biologischen Halbwertszeit von 3,8 h berechnet werden (D). Die zeitliche Radioiodaufnahme ist als Mittelwert und Standardfehler aus den einzelnen Tieren der HIF-NIS-MSC-Gruppe dargestellt. SD, Schilddrüse; SPD, Speicheldrüse.

Für eine detailliertere Analyse der Hypoxie-induzierten NIS-Expression im subkutanen HuH7 Tumor wurde, zusätzlich zur 2-dimensionalen ^{123}I -Szintigraphie, auch ein 3-dimensionales ^{124}I -PET durchgeführt. Die Aufnahmen erfolgten 3 h nach der ^{124}I -Injektion und bestätigten die erhöhte Radionuklidakkumulation im Tumor nach Applikation der HIF-NIS-MSCs (Abb. 11 A). Zusätzlich ermöglichte das ^{124}I -PET eine detaillierte Analyse der Radioiodintensität in den einzelnen Tumorschichten. Die stärkste ^{124}I -Aufnahme wurde in den hypoxischeren Arealen im Kern des Tumors beobachtet, wohingegen die weniger hypoxischen Randbereiche des Tumors eine geringere ^{124}I -Aufnahme zeigten. Auch in diesem Fall konnte durch die Gabe von Perchlorat die ^{124}I -Aufnahme im Tumor, der Schilddrüse, der Speicheldrüse und im Magen blockiert werden (Abb. 11 B).

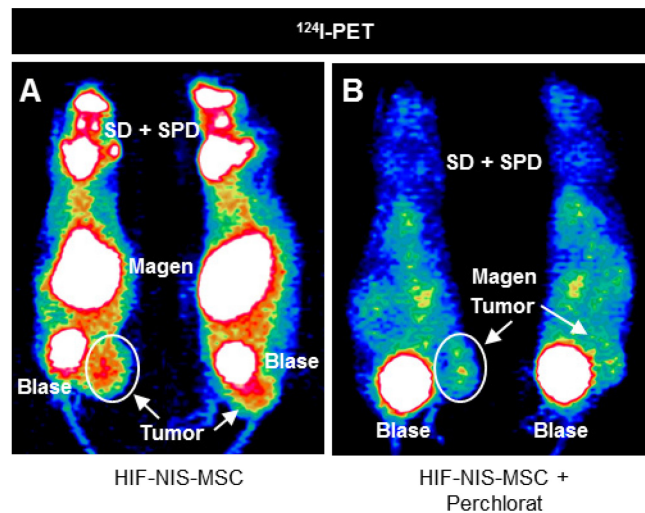


Abb. 11: Hypoxie-induzierte, NIS-vermittelte ^{124}I -Aufnahme im Tumor nach intravenöser Applikation der HIF-NIS-MSCs in ein subkutanes HuH7 Xenograftmausmodell. Die ^{124}I -PET-Aufnahmen zeigten, dass die intravenöse Applikation der HIF-NIS-MSCs eine erhöhte ^{124}I -Aufnahme im Tumor 3 h nach Applikation des Radionuklids induzierte (A; n = 4), welche durch den NIS-spezifischen Inhibitor Perchlorat blockiert werden konnte (B; n = 2). Dargestellt ist eine repräsentative ^{124}I -PET-Aufnahme pro Gruppe in Frontalansicht (links) und Seitenansicht (rechts). SD, Schilddrüse; SPD, Speicheldrüse.

Das ^{124}I -PET ermöglicht eine detaillierte 3-dimensionale Analyse der NIS-Expression. Allerdings weist dieses auch einige Nachteile auf, was dessen routinemäßige Anwendung als PET-Tracer schwierig macht. Nicht nur, dass die Produktion von ^{124}I relativ komplex und dadurch dessen Verfügbarkeit limitiert ist, ^{124}I hat nur eine geringe Positronenausbeute von ca. 23% und eine lange Halbwertszeit von 4,2 Tagen (Jauregui-Osoro *et al.*, 2010). Zudem führen die hohe Positronenendenergie und die Kaskadengammas, welche gleichzeitig mit dem Positronenzerfall emittiert werden, zu einer eingeschränkten Bildqualität (Jauregui-Osoro *et al.*, 2010). Ein idealer PET-Tracer ist hingegen das ^{18}F , da dieses eine hohe Positronenabundanz von 89% und eine kurze Halbwertszeit von 109 min aufweist, welche mit den meisten bildgebenden Verfahren kompatibel ist (Jauregui-Osoro *et al.*, 2010). Um sich diese Vorteile von ^{18}F auch für die Darstellung der NIS-Expression zunutze machen zu können, wurde das ^{18}F -TFB entwickelt (Jauregui-Osoro *et al.*, 2010). Dieses wird, wie ^{124}I , von NIS transportiert und ermöglicht somit gleichermaßen eine nicht-invasive Darstellung der NIS-Expression durch PET-Aufnahmen. Auch unter Verwendung dieses neuen PET Tracers konnte, nach systemischer Applikation der HIF-NIS-MSCs, eine Perchlorat-abhängige NIS-Expression 2 h nach Applikation des Radionuklids im Tumor detektiert werden, wodurch die Ergebnisse des ^{124}I -PETs bestätigt werden konnten. Die erhöhte Bildqualität ermöglichte zusätzlich eine detailliertere Darstellung der einzelnen NIS-exprimierenden Organe/Gewebe, wodurch diese besser abgegrenzt und deren Radionuklidaufnahme besser quantifiziert werden kann (Abb. 12).

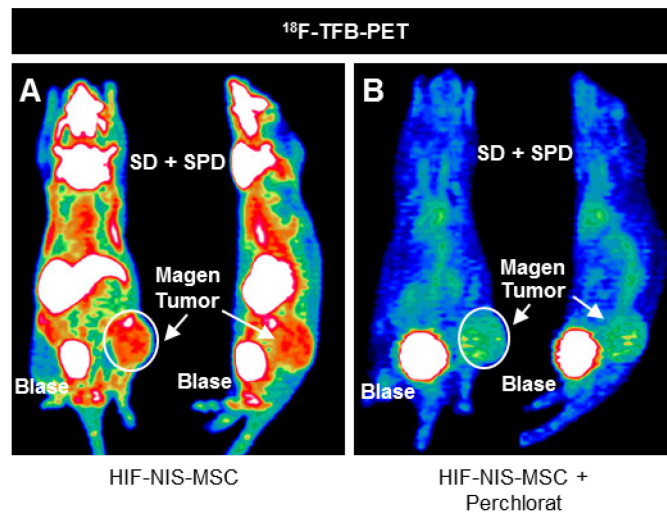


Abb. 12: Hypoxie-induzierte, NIS-vermittelte ^{18}F -TFB-Aufnahme im Tumor nach intravenöser Applikation der HIF-NIS-MSCs in ein subkutanes HuH7 Xenograftmausmodell. Durch die systemische Injektion der HIF-NIS-MSCs konnte 2 h nach Applikation des Radionuklids eine erhöhte, Perchlorat-abhängige ^{18}F -TFB-Aufnahme im Tumor durch das ^{18}F -TFB-PET detektiert werden (- Perchlorat: n = 6, A; + Perchlorat: n = 2, B). Gezeigt ist eine repräsentative ^{18}F -TFB-PET-Aufnahme pro Gruppe in Frontalansicht (links) und Seitenansicht (rechts). SD, Schilddrüse; SPD, Speicheldrüse.

Für eine quantitative Analyse der HIF-NIS-MSC-vermittelten Radionuklidakkumulation im Tumor und weiteren Nichtzielorganen wurde eine *ex vivo* ^{123}I -Biodistributionsanalyse durchgeführt. Die HIF-NIS-MSCs wurden hierfür im gleichen Intervall injiziert, wie für die ^{123}I -Szintigraphie oder das $^{124}\text{I}/^{18}\text{F}$ -TFB-PET. 4 h nach der ^{123}I -Injektion wurde die Radioiodaufnahme im Tumor und einer Reihe weiterer Nichtzielorgane/Nichtzielgewebe (Herz, Leber, Lunge, Niere, Milz, Haut, Muskel, Blut und Darm) ermittelt. Die Ergebnisse zeigten, dass durch die systemische Injektion der HIF-NIS-MSCs eine ^{123}I -Aufnahme von $1,6 \pm 0,5\%$ ID/g im Tumor erzielt werden konnte, welche wiederum durch die Applikation von Perchlorat stark vermindert wurde. Die Nichtzielorgane hingegen zeigten, im Vergleich zum Tumor, eine deutlich verminderte ^{123}I -Akkumulation (Abb. 13).

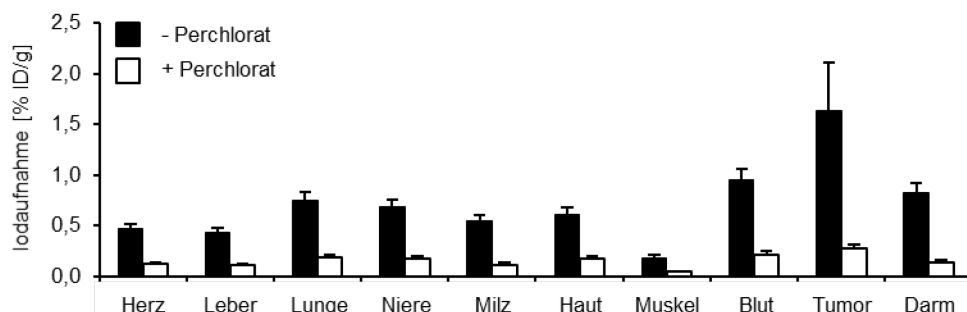


Abb. 13: Hypoxie-induzierte, NIS-vermittelte ^{123}I -Aufnahme im Tumor, im Vergleich zu Nichtzielorganen, nach intravenöser Applikation der HIF-NIS-MSCs in ein subkutanes HuH7 Xenograftmausmodell. Durch eine *ex vivo* ^{123}I -Biodistributionsanalyse konnte eine Perchlorat-abhängige ^{123}I -Aufnahme von $1,6 \pm 0,5\%$ ID/g im Tumor von HIF-NIS-MSC-behandelten Mäusen (-Perchlorat: n = 12; + Perchlorat: n = 5) 4 h nach Applikation des Radionuklids gemessen werden. Alle weiteren analysierten Organe/Gewebe (Herz, Leber, Lunge, Niere,

Milz, Haut, Muskel, Blut und Darm) zeigten eine deutlich verminderte ^{123}I -Akkumulation. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte und Standardfehler aus den einzelnen Tieren einer Gruppe dargestellt.

Im Anschluss an die ^{123}I -Szintigraphie bzw. das $^{124}\text{I}/^{18}\text{F}$ -TFB-PET wurden die Verteilung der MSCs im Tumor und einer Reihe weiterer Organe (Lunge, Leber, Niere und Milz) sowie die Hypoxie-vermittelte NIS-Expression immunhistochemisch ermittelt. Zur Detektion der MSCs wurde ein Antikörper verwendet, welcher gegen das *SV40 large T antigen* gerichtet ist. Da die MSCs damit immortalisiert wurden, kann dieses für einen spezifischen Nachweis der MSCs verwendet werden. Die immunhistochemischen Analysen zeigten, dass sowohl die HIF-NIS-MSCs als auch die WT-MSCs zum Tumor migrieren (Abb. 14 B, D). Allerdings war nur nach Applikation der HIF-NIS-MSCs auch eine NIS-Expression im Tumor nachweisbar (Abb. 14 A, C). Die MSCs sind vorwiegend in der Nähe der Blutgefäße detektierbar, wohingegen NIS-exprimierende MSCs nur mit zunehmender Distanz zu den Blutgefäßen zu beobachten sind. In der Leber, der Lunge und der Niere konnten weder MSCs noch NIS detektiert werden (Abb. 14 E-J). In der Milz hingegen konnte eine geringe Anzahl HIF-NIS-MSCs nachgewiesen werden, welche aber kein NIS exprimierten (Abb. 14 K, L).

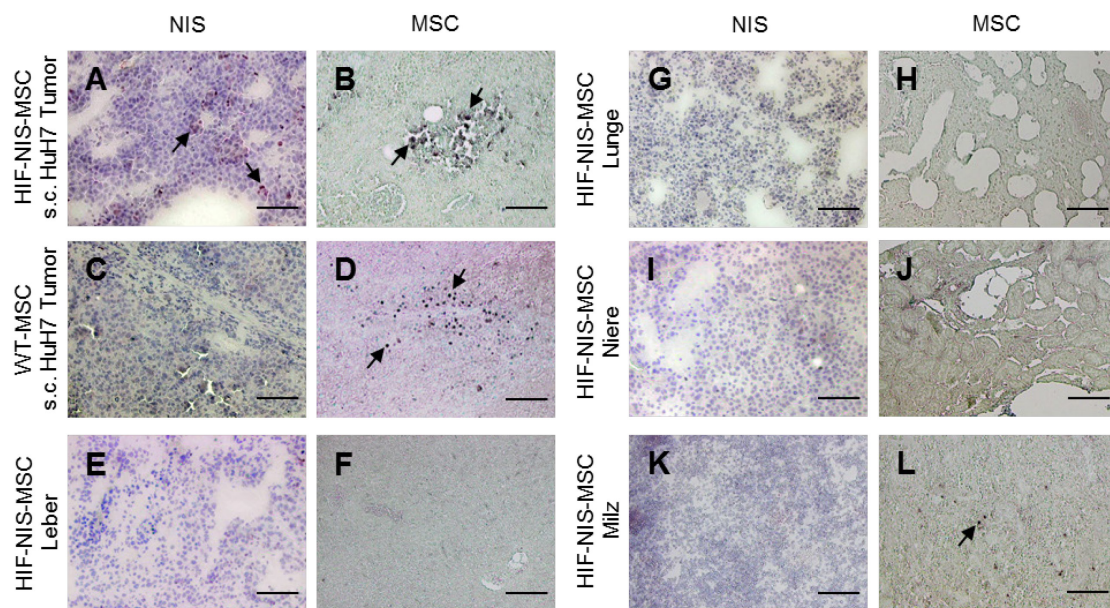


Abb. 14: Hypoxie-induzierte NIS-Expression im Tumor nach intravenöser Applikation der HIF-NIS-MSCs in ein subkutanes HuH7 Xenograftmausmodell. Anhand immunhistochemischer Analysen konnte sowohl nach Applikation der HIF-NIS-MSCs als auch nach Applikation der WT-MSCs, eine tumorale MSC-Rekrutierung nachgewiesen werden (B, D), welche allerdings nur nach Injektion der HIF-NIS-MSCs mit einer Hypoxie-vermittelten NIS-Expression assoziiert war (A, C). In der Leber, Lunge und Niere konnten weder MSCs noch eine NIS-Expression nachgewiesen werden (E-J). Lediglich in der Milz war ein geringer Teil der HIF-NIS-MSCs detektierbar, welcher aber keine NIS-Expression zeigte (K, L). Dargestellt ist eine repräsentative Färbung pro Gewebe. Maßstab = 100 μm .

Nachdem durch immunhistochemische Analysen eine Rekrutierung der HIF-NIS-MSCs in das Tumorstroma der subkutanen HuH7 Tumoren und eine Hypoxie-vermittelte NIS-Expression

nachgewiesen werden konnten, welche in der ^{123}I -Szintigraphie, im ^{124}I -/ ^{18}F -TFB-PET und in der *ex vivo* ^{123}I -Biodistributionsanalyse zu einer erhöhten Radionuklidaufnahme im Tumor, nicht aber in Nichtzielorganen führte, wurde im Anschluss das Potenzial einer HIF-NIS-MSC-vermittelten ^{131}I -Therapie evaluiert. Das Therapieansprechen beruht auf den β -Strahlen des ^{131}I , welche nicht nur die NIS-exprimierenden MSCs zerstören können, sondern auch die umliegenden Tumorzellen. Für diese Therapiestudie wurden drei verschiedene Mausgruppen etabliert: eine Therapiegruppe, welcher die HIF-NIS-MSCs in Kombination mit ^{131}I appliziert wurden und zwei Kontrollgruppen, von welcher eine die HIF-NIS-MSCs in Kombination mit NaCl und die andere die WT-MSCs in Kombination mit ^{131}I injiziert bekam. Die erste Kontrollgruppe sollte zeigen, dass die potenziellen Therapieeffekte auf eine NIS-vermittelte ^{131}I -Aufnahme zurückzuführen sind und nicht von den HIF-NIS-MSCs alleine stammen. Die zweite Kontrollgruppe sollte zeigen, dass die potenziellen Therapieeffekte nicht von ^{131}I alleine stammen. Zudem können durch die WT-MSC + ^{131}I -Gruppe potenzielle toxische Effekte des ^{131}I , welche das Therapieansprechen beeinflussen können, evaluiert werden. Für die Therapiestudie wurden die MSCs drei Mal in einem Abstand von 48 h injiziert, gefolgt von einer ^{131}I -Applikation bzw. NaCl-Injektion 48 h später. Dieser Zyklus wurde nach 24 h wiederholt, gefolgt von einer letzten MSC-Applikation 24 h später und einer letzten ^{131}I - bzw. NaCl-Injektion nach weiteren 48 h. Es konnte kein Unterschied im Tumorwachstum bzw. in der Tumorumfangzunahme oder im Mausüberleben zwischen der Therapie- (HIF-NIS-MSC + ^{131}I) und den Kontrollgruppen (HIF-NIS-MSC + NaCl bzw. WT-MSC + ^{131}I) beobachtet werden (Abb. 15).

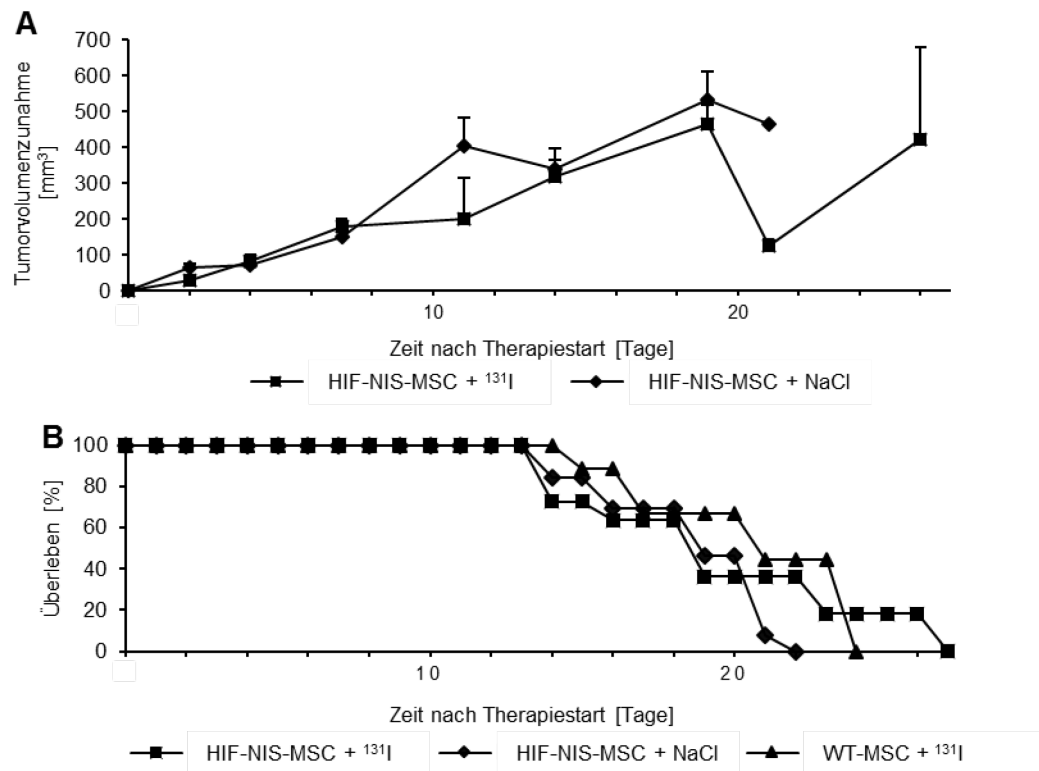


Abb. 15: Keine Induktion eines therapeutischen Effekts nach HIF-NIS-MSC-vermittelter ¹³¹I-Aufnahme in den Tumor eines subkutanen HuH7 Xenograftmausmodells. Zur Analyse des therapeutischen Potenzials der HIF-NIS-MSC-vermittelten Radioiodtherapie zur Behandlung subkutaner HuH7 Tumoren, wurden eine Therapiegruppe (HIF-NIS-MSC + ¹³¹I; n = 11) und zwei Kontrollgruppen (HIF-NIS-MSC + NaCl; n = 13 und WT-MSC + ¹³¹I; n = 9) etabliert. Die MSC-Applikation erfolgte drei Mal in einem Abstand von 48 h, gefolgt von einer ¹³¹I- bzw. NaCl-Injektion nach weiteren 48 h. 24 h später wurde dieser Zyklus wiederholt, gefolgt von einer letzten MSC-Applikation 24 h später und einer letzten ¹³¹I- bzw. NaCl-Injektion 48 h später. Durch die HIF-NIS-MSC-vermittelte ¹³¹I-Aufnahme konnte kein Unterschied im Tumorwachstum bzw. in der Tumorzunahme (A) oder im Mausüberleben (B), im Vergleich zu den Kontrollgruppen, beobachtet werden. Die Ergebnisse der Tumorzunahme sind als Mittelwerte und Standardfehler und die Ergebnisse der Überlebenskurven als prozentuale Werte aus den einzelnen Tieren einer Gruppe dargestellt.

Nach Beendigung der Therapiestudie wurde der Effekt der HIF-NIS-MSC-vermittelten ¹³¹I-Aufnahme auf die Tumorzellproliferation und die Blutgefäßdichte im Tumor, im Vergleich zu Tumoren der Kontrollgruppen, immunhistochemisch analysiert. Der Nachweis proliferierender Tumorzellen erfolgte anhand eines Antikörpers, welcher gegen Ki67 gerichtet ist, und der Nachweis der Blutgefäße anhand eines CD31-spezifischen Antikörpers. Die Analysen zeigten keinen signifikanten Unterschied in der Tumorzellproliferation und Blutgefäßdichte zwischen der Therapiegruppe (HIF-NIS-MSC + ¹³¹I; Ki67: $66,13 \pm 1,69\%$; CD31: $6,07 \pm 1,69\%$; Abb. 16 A, D, E) und den Kontrollgruppen (Ki67: HIF-NIS-MSC + NaCl: $68,95 \pm 2,83\%$; WT-MSC + ¹³¹I: $61,20 \pm 3,50\%$; CD31: HIF-NIS-MSC + NaCl: $6,18 \pm 0,62\%$; WT-MSC + ¹³¹I: $5,46 \pm 0,13$; Abb. 16 B-E) und bestätigten somit die Therapiedaten.

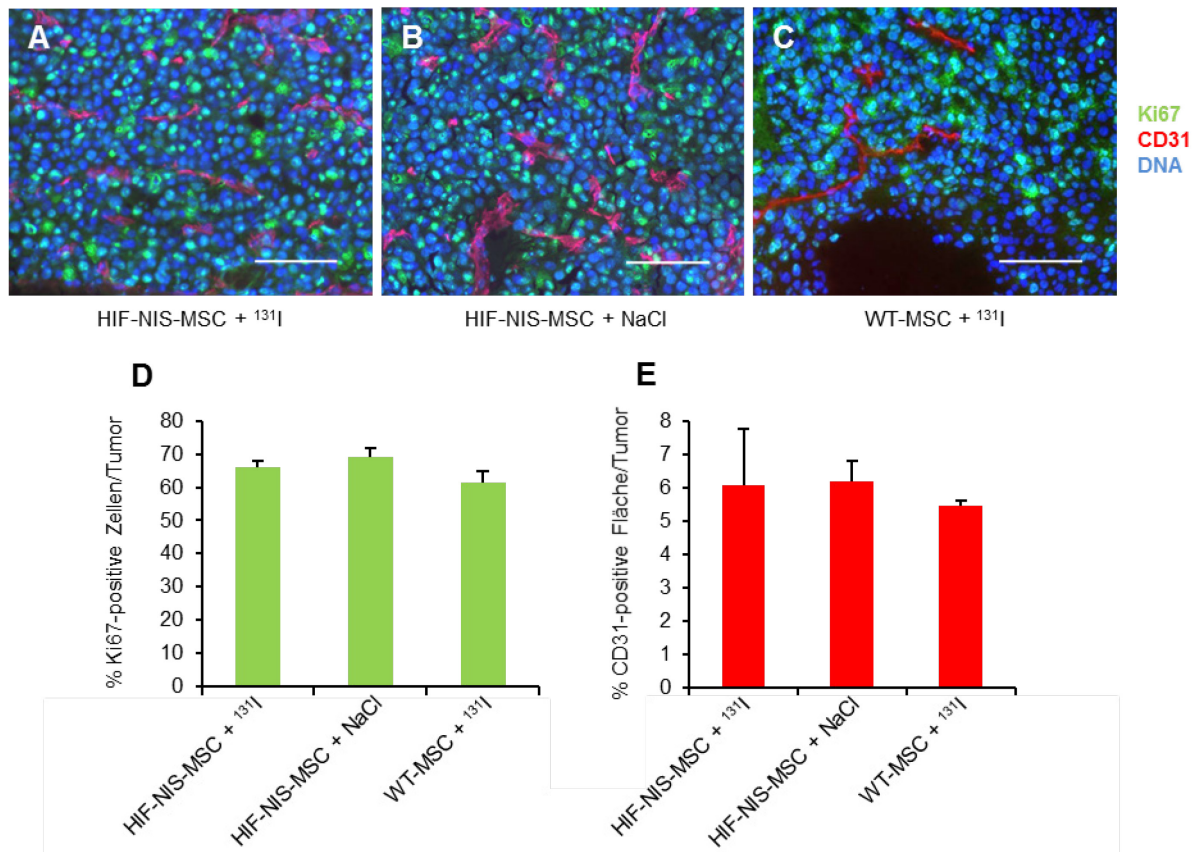


Abb. 16: Keine Reduktion der Tumorzellproliferation oder der Blutgefäßdichte im Tumor, nach HIF-NIS-MSC-vermittelter ^{131}I -Aufnahme in den Tumor eines subkutanen HuH7 Xenograftmausmodells. Die Radioiodtherapie nach systemischer HIF-NIS-MSC-Applikation führte zu keinem signifikanten Unterschied in der Tumorzellproliferation oder der Blutgefäßdichte im Tumor in der Therapiegruppe (HIF-NIS-MSC + ^{131}I ; Ki67: $66,13 \pm 1,69\%$; CD31: $6,07 \pm 1,69\%$; A, D, E), im Vergleich zu den Kontrollgruppen (Ki67: HIF-NIS-MSC + NaCl: $68,95 \pm 2,83\%$; WT-MSC + ^{131}I : $61,20 \pm 3,50\%$; CD31: HIF-NIS-MSC + NaCl: $6,18 \pm 0,62\%$; WT-MSC + ^{131}I : $5,46 \pm 0,13\%$; B-E). Dargestellt sind eine repräsentative Färbung sowie die Mittelwerte und Standardfehler aus den einzelnen Tieren einer Gruppe. Maßstab = 100 μm .

3.3 Analyse der Hypoxie-induzierten NIS-Expression in einem orthotopen HuH7 Xenograftmausmodell

Nach der Evaluierung der MSC-vermittelten, Hypoxie-induzierten NIS-Expression in einem subkutanen HuH7 Xenograftmausmodell wurde dieser Ansatz im nächsten Schritt in einem orthotopen HuH7 Xenograftmausmodell analysiert. Ein subkutanes Tumormodell ist häufig die erste Wahl, um den generellen Erfolg einer Therapiestrategie abschätzen zu können, da die Tumoren einfach zu induzieren sind, die Tumorgöße leicht gemessen werden und somit auch das Tumorstadium leicht überwacht werden kann (Bagi, Swanson & Tuthill, 2011). Allerdings können in diesem Tumormodell die komplexen Interaktionen zwischen den Tumorzellen und ihrer Umgebung sowie der Einfluss einer bereits bestehenden Vaskularisierung, nicht ausreichend gut abgebildet werden (Bagi *et al.*, 2011). Ein orthotopes Tumormodell stellt das Tumormilieu im HCC-Patienten besser dar und ermöglicht somit eine realistischere Abschätzung des Erfolgs einer

Therapiestrategie. Zur Etablierung der orthotopen HuH7 Xenograft Tumoren wurden die Tumorzellen nach einer Laparotomie direkt in die Leber der Maus injiziert. Nach ca. 2-3 Wochen ist ein Tumor mit einer Größe von wenigen Millimetern, welcher aus dem Lebergewebe wächst, sichtbar. Nach ca. 5 Wochen bedeckt der Tumor ca. 70% der Leberfläche, wobei es zu keinem Zeitpunkt zu einer Metastasenbildung kommt (Abb. 17 A). Für eine histologische Analyse des Gewebes wurde die Leber mit dem orthotopen HuH7 Tumor entnommen und HE gefärbt. Diese Färbung zeigte eine gleichmäßige Morphologie des gesunden Lebergewebes und eine ungleichmäßige, mit kleinen nekrotischen Arealen durchzogene, Struktur des Tumors (Abb. 17 B). Die nekrotischen Areale sind auf eine erhöhte Tumorzellproliferation und eine damit verbundene Unterversorgung des Gewebes mit Sauerstoff und Nährstoffen zurückzuführen.

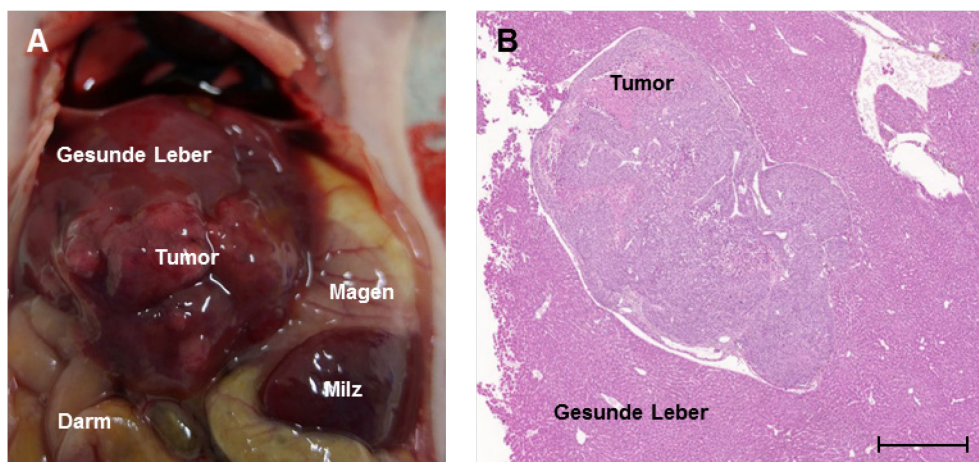


Abb. 17: Makroskopische und mikroskopische Darstellung eines orthotopen HuH7 Tumors. Die Injektion von HuH7 Zellen nach einer Laparotomie in die Leber der Maus führte, nach ca. 2-3 Wochen, zur Ausbildung eines orthotopen Lebertumors, welcher nach 5 Wochen ca. 70% der Leber bedeckte (A). Die HE-Färbung eines orthotopen HuH7 Tumors zeigte eine gleichmäßige Struktur der Leber und eine ungleichmäßige, mit kleineren nekrotischen Arealen durchzogene, Struktur des Tumors (B). Gezeigt ist eine repräsentative makroskopische und mikroskopische Darstellung eines orthotopen HuH7 Tumors. Maßstab = 500 µm.

Nach der Etablierung des orthotopen HuH7 Xenograftmausmodells wurden die MSC-Rekrutierung und die Hypoxie-vermittelte NIS-Expression durch ^{124}I -PET-Aufnahmen analysiert. In diesem Modell wurde keine ^{123}I -Szintigraphie, wie im subkutanen Modell, für eine erste Abschätzung der HIF-NIS-MSC-vermittelten Radionuklidaufnahme durchgeführt, da der orthotope Lebertumor in direkter Nachbarschaft zu dem NIS-exprimierenden Magen liegt und somit durch eine 2-dimensionale ^{123}I -Szintigraphie keine klare Abgrenzung der Signale möglich ist. Die MSC-Applikationen für das ^{124}I -PET erfolgten nach dem gleichen Schema, wie für das subkutane Modell. Die Analyse der ^{124}I -PET-Aufnahmen zeigten eine Radioiodakkumulation im Tumor von $6,9 \pm 0,9\%$ ID/g 1 h nach der Radioiodapplikation in HIF-NIS-MSCs-behandelte Mäuse mit einer biologischen Halbwertszeit von 4,0 h (Abb. 18 A, D). Über dosimetrische Berechnungen konnte eine Tumor-absorbierte Dosis von 46,8 mGy/MBq/g Tumor ^{131}I mit einer effektiven Halbwertszeit von 3,9 h errechnet werden. Die

^{124}I -Aufnahme im Tumor, der Schilddrüse, der Speicheldrüse und im Magen konnte durch vorherige Applikation von Perchlorat blockiert werden (Abb. 18 B). Eine Injektion von WT-MSCs führte zu keiner signifikanten ^{124}I -Akkumulation im Tumor (Abb. 18 C).

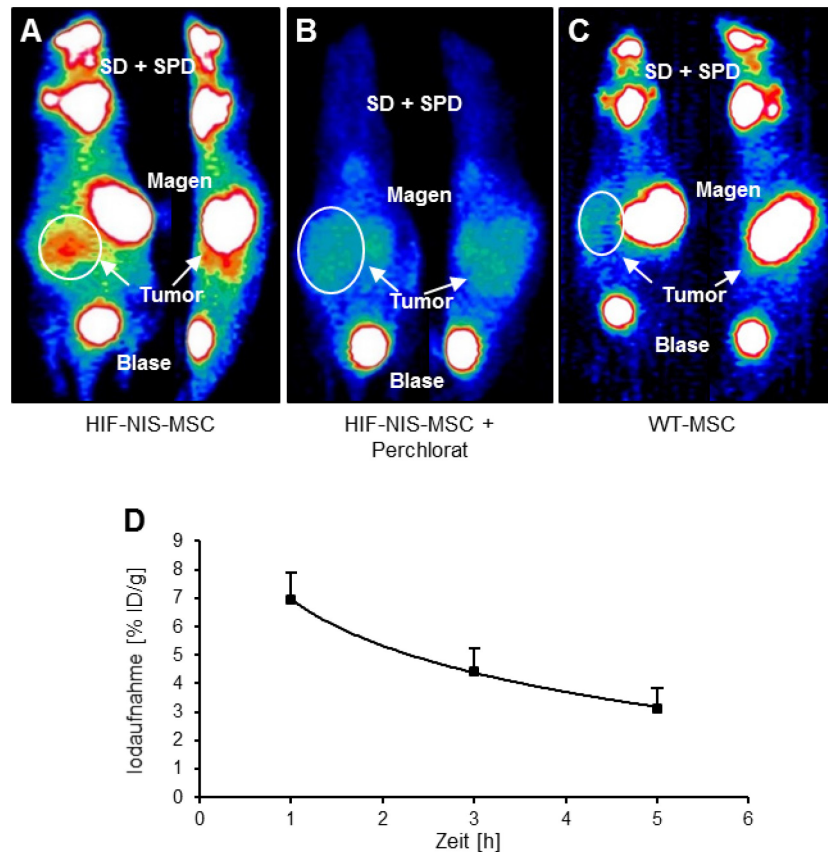


Abb. 18: Hypoxie-induzierte, NIS-vermittelte ^{124}I -Aufnahme im Tumor nach intravenöser Applikation der HIF-NIS-MSCs in ein orthotopes HuH7 Xenograftmausmodell. Nach systemischer Applikation der HIF-NIS-MSCs konnte durch ^{124}I -PET Analyse eine maximale Radioiodaufnahme von $6,9 \pm 0,9\%$ ID/g im Tumor 1 h nach Radioiodapplikation mit einer biologischen Halbwertszeit von 4,0 h ermittelt werden (A, D; n = 6). Diese wiederum wurde durch eine vorherige Applikation von Perchlorat stark vermindert (B; n = 3). Nach systemischer Injektion von WT-MSCs konnte keine signifikante ^{124}I -Aufnahme im Tumor detektiert werden (C; n = 2). Dargestellt ist eine repräsentative ^{124}I -PET-Aufnahme pro Gruppe sowie die Mittelwerte und Standardfehler der zeitlichen Radioiodaufnahme der einzelnen Tiere der HIF-NIS-MSC-Gruppe. SD, Schilddrüse; SPD, Speicheldrüse.

Nach der bildgebenden Analyse der ^{124}I -Aufnahme in der Maus, nach systemischer Applikation der HIF-NIS-MSCs, wurde diese darauffolgend quantitativ über eine *ex vivo* ^{123}I -Biodistributionsanalyse untersucht. Diese erfolgte auf die gleiche Weise wie für das subkutane HuH7 Xenograftmausmodell. Die quantitative Auswertung der ^{123}I -Aufnahme im Tumor 4 h nach Applikation des Radionuklids zeigte eine Radioiodakkumulation von $3,5 \pm 0,6\%$ ID/g, welche durch Perchlorat signifikant gesenkt werden konnte. In allen weiteren analysierten Organen/Geweben (Herz, Leber, Lunge, Niere, Milz, Haut, Muskel, Blut und Darm) konnte keine spezifische ^{123}I -Aufnahme detektiert werden (Abb. 19).

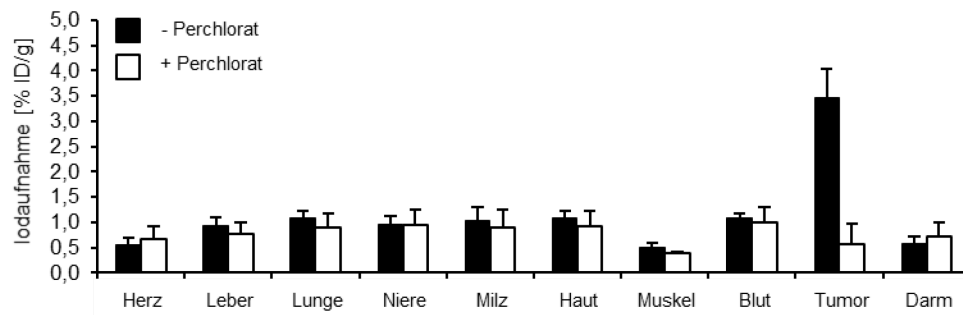


Abb. 19: Hypoxie-induzierte, NIS-vermittelte ^{123}I -Aufnahme im Tumor, im Vergleich zu Nichtzielorganen, nach intravenöser Applikation der HIF-NIS-MSCs in ein orthotopes HuH7 Xenograftmausmodell. Die *ex vivo* ^{123}I -Biodistributionsanalyse zeigte eine Perchlorat-abhängige ^{123}I -Aufnahme von $3,5 \pm 0,6\%$ ID/g im Tumor 4 h nach Applikation des Radionuklids in HIF-NIS-MSC-behandelten Mäusen (- Perchlorat: $n = 6$; + Perchlorat: $n = 3$). Alle weiteren analysierten Organe/Gewebe (Herz, Leber, Lunge, Niere, Milz, Haut, Muskel, Blut und Darm) zeigten keine ^{123}I -Akkumulation über das Hintergrundsignal hinaus. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte und Standardfehler aus den einzelnen Tieren einer Gruppe dargestellt.

Im nächsten Schritt wurde eine immunhistochemische Analyse des orthotopen Lebertumors, der gesunden Leber, der Lunge, der Niere und der Milz durchgeführt, um Aufschluss über die MSC-Verteilung innerhalb der Maus und über die Hypoxie-vermittelte NIS-Expression zu erlangen. Diese Analysen zeigten eine hohe Dichte an MSCs im Tumor sowohl nach Applikation der HIF-NIS-MSCs als auch nach der Injektion der WT-MSCs (Abb. 20 B, D). Eine Hypoxie-vermittelte NIS-Expression konnte allerdings nur nach der Injektion der HIF-NIS-MSCs beobachtet werden (Abb. 20 A, C). Im Vergleich zum subkutanen Modell konnte im orthotopen HuH7 Tumor eine höhere Anzahl an MSCs nachgewiesen werden (Abb. 14 B, D; Abb. 20 B, D), welche im Falle der HIF-NIS-MSCs zu einer erhöhten NIS-Expression im Tumor führte (Abb. 14 A; Abb. 20 A). Die MSCs sind, wie im subkutanen HuH7 Tumor, in einer großen Anzahl in der Nähe der Blutgefäße nachweisbar. Die NIS-Expression hingegen nimmt mit zunehmender Distanz zu den Blutgefäßen zu. In der gesunden, nicht tumorigenen Leber und in anderen Nichtzielorganen, wie der Lunge und der Niere, sind weder MSCs noch NIS-Expression nachweisbar (Abb. 20 E-J). In der Milz wurde eine geringe Anzahl an HIF-NIS-MSCs beobachtet, welche allerdings keine NIS-Expression zeigten (Abb. 20 K, L).

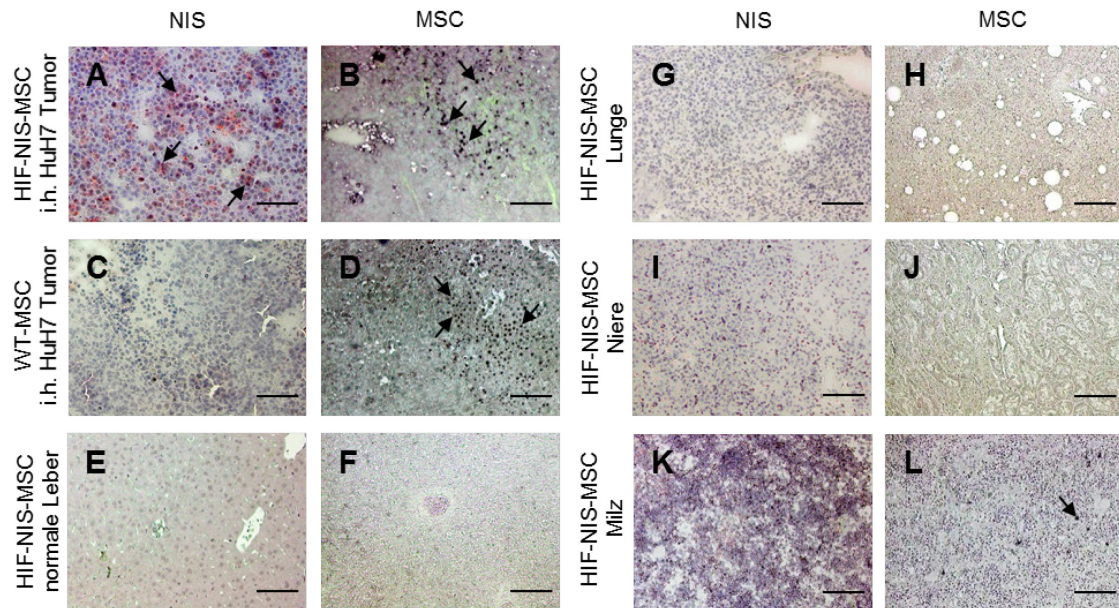


Abb. 20: Hypoxie-induzierte NIS-Expression im Tumor nach intravenöser Applikation der HIF-NIS-MSCs in ein orthotopes HuH7 Xenograftmausmodell. Durch immunhistochemische Analysen konnte sowohl nach Applikation der HIF-NIS-MSCs als auch nach Applikation der WT-MSCs, eine tumorale MSC-Rekrutierung nachgewiesen werden (B, D), welche nur nach Applikation der HIF-NIS-MSCs zu einer Hypoxie-vermittelten NIS-Expression führte (A, C). In der normalen Leber, Lunge und Niere konnten weder MSCs noch NIS-Expression detektiert werden (E-J). Lediglich in der Milz waren HIF-NIS-MSCs nachweisbar, welche aber keine NIS-Expression zeigten (K, L). Gezeigt ist eine repräsentative Färbung pro Gewebe. Maßstab = 100 µm.

In einer anschließenden Therapiestudie wurde das Potenzial der Hypoxie-vermittelten NIS-Expression für eine Radioiodtherapie des orthotopen Lebertumors ermittelt. Für diese Therapiestudie wurden, wie für das subkutane HuH7 Xenograftmausmodell, drei Mausgruppen etabliert: die Therapiegruppe (HIF-NIS-MSC + ^{131}I) und zwei Kontrollgruppen (HIF-NIS-MSC + NaCl und WT-MSC + ^{131}I). Die MSC- und ^{131}I - bzw. NaCl-Applikationen erfolgten nach dem gleichen Schema, wie für das subkutane Modell. Das Tumorwachstum und die Tumorperfusion wurden in diesem Modell durch CEUS ermittelt. Die Applikation von ^{131}I in Mäuse, welchen HIF-NIS-MSCs injiziert wurden, führte zu einem langsameren Tumorwachstum bzw. zu einer langsameren Tumolvolumenzunahme, im Vergleich zu Mäusen, welche die HIF-NIS-MSCs in Kombination mit NaCl appliziert bekommen haben (Abb. 21 A-C). Das langsamere Tumorwachstum der Therapiegruppe war mit einem signifikant verlängerten Überleben der Mäuse, im Vergleich zu den Kontrollgruppen, assoziiert (Abb. 21 D). Die Mäuse der Kontrollgruppen überlebten lediglich bis zu 4 Wochen, wohingegen die Mäuse der Therapiegruppe bis zu 9 Wochen nach Therapiestart überlebten.

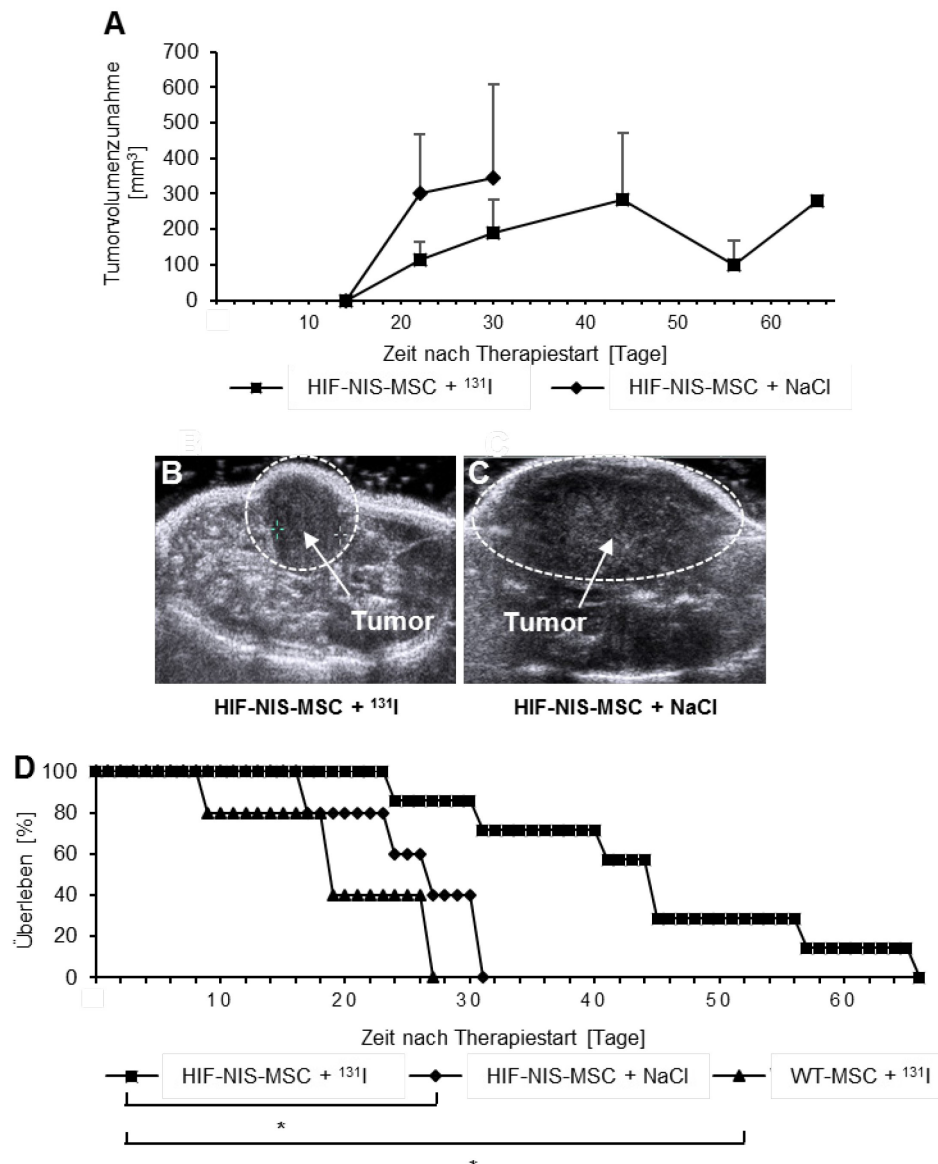


Abb. 21: Induktion therapeutischer Effekte nach HIF-NIS-MSC-vermittelter ¹³¹I-Aufnahme in den Tumor eines orthotopen HuH7 Xenograftmausmodells. Für die Evaluierung des therapeutischen Potenzials der HIF-NIS-MSC-vermittelten ¹³¹I-Aufnahme zur Therapie orthotoper HuH7 Tumoren wurden eine Therapiegruppe (HIF-NIS-MSC + ¹³¹I; n = 7) und zwei Kontrollgruppen (HIF-NIS-MSC + NaCl; n = 5 und WT-MSC + ¹³¹I; n = 5) etabliert. Die MSC-Applikation erfolgte drei Mal in einem Abstand von 48 h, gefolgt von einer ¹³¹I- bzw. NaCl-Injektion nach weiteren 48 h. 24 h später wurde dieser Zyklus wiederholt, gefolgt von einer letzten MSC-Applikation 24 h später und einer letzten ¹³¹I- bzw. NaCl-Injektion 48 h später. Die HIF-NIS-MSC-vermittelte ¹³¹I-Aufnahme führte zu einem langsameren Tumorwachstum bzw. zu einer langsameren Tumorvolumenzunahme (A-C) und zu einem signifikant verlängerten Überleben, im Vergleich zu den Kontrollgruppen (D). Gezeigt ist eine repräsentative CEUS-Aufnahme pro Gruppe. Die Ergebnisse der Tumorvolumenzunahme sind als Mittelwerte und Standardfehler und die Ergebnisse der Überlebenskurven als prozentualer Wert aus den einzelnen Tieren einer Gruppe dargestellt (**p*<0,05).

Ein weiteres Kriterium zur Evaluierung des Therapieerfolgs ist die Analyse der Tumorperfusion, da durch die β -Strahlen des ¹³¹I nicht nur die NIS-exprimierenden MSCs und umliegende Tumorzellen, sondern auch umliegende Zellen der Blutgefäße zerstört werden können, was eine geringere Tumorperfusion mit sich bringt. Für diese Untersuchungen wurde den Mäusen das Kontrastmittel

SonoVue® intravenös injiziert und dessen Anflutung im Tumor über die Zeit gemessen. Aus der daraus gewonnen zeitabhängigen Signalintensitätskurve konnten die vier Perfusions-bezogenen Parameter PE (Differenz zwischen der initialen $V(T_0)$ und maximalen Signalintensität $V(T_{max})$), WiAUC (Fläche zwischen T_0 und T_{max}), WiR (Steigung der Tangente bei halbmaximaler Anflutung) und WiPI (WiAUC/Zeit zwischen T_0 und T_{max}) abgeleitet werden (Poret-Bazin *et al.*, 2013). Die Auswertung der Perfusionsdaten zeigte ein geringeres Kontrastmittelsignal (Abb. 22 A), ein geringeres PE ($3652,6 \pm 1364,0$; Abb. 22 B), eine geringere WiAUC ($32089,9 \pm 14842,2$; Abb. 22 C), eine geringere WiR ($600,4 \pm 172,2$; Abb. 22 D) und einen geringeren WiPI ($2556,7 \pm 960,5$; Abb. 22 E) für die Therapiegruppe, im Vergleich zur Kontrollgruppe (HIF-NIS-MSC + NaCl; PE: $9281,9 \pm 674,0$; WiAUC: $86506,3 \pm 7779,2$; WiR: $1269,1 \pm 106,0$; WiPI: $6315,4 \pm 342,3$; Abb. 22 A-E).

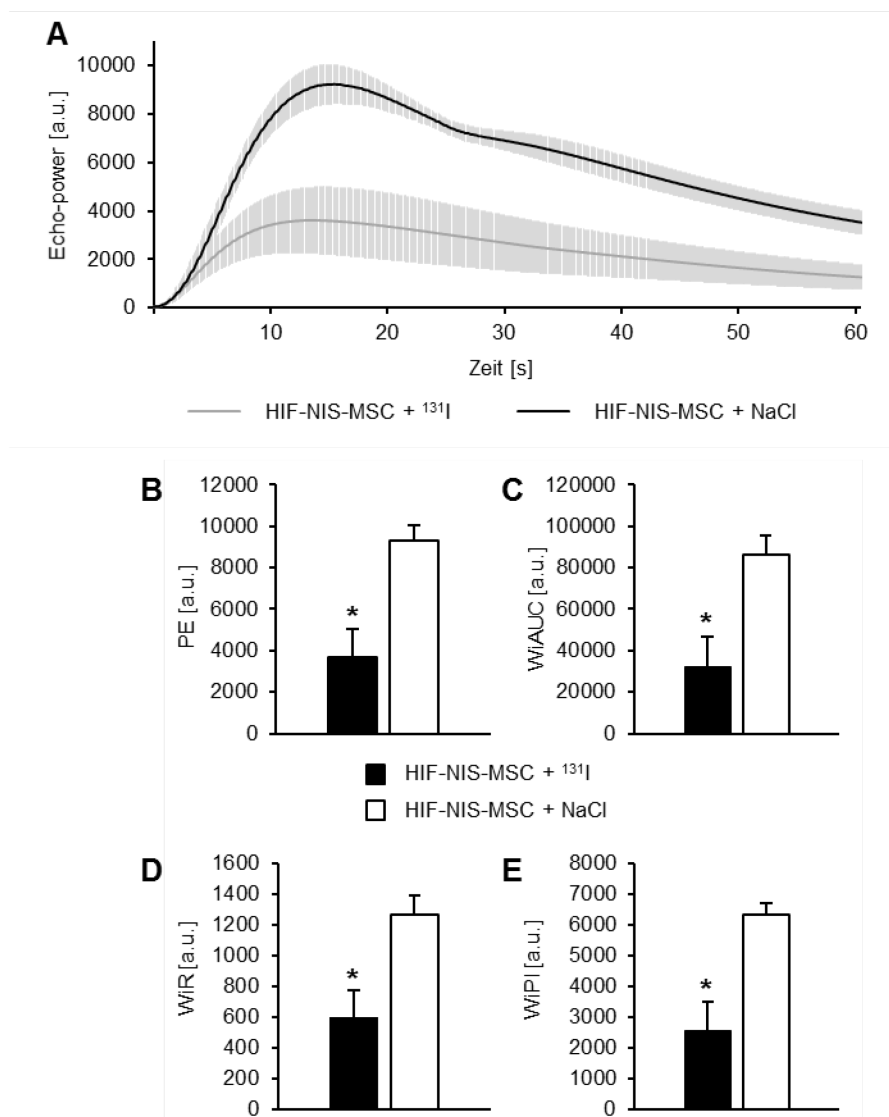


Abb. 22: Geringere Tumorperfusion nach HIF-NIS-MSC-vermittelter ^{131}I -Aufnahme in den Tumor eines orthotopen HuH7 Xenograftmausmodells. Durch die HIF-NIS-MSC-vermittelte ^{131}I -Aufnahme im Tumor konnte ein geringeres Kontrastmittelsignal (A), ein geringeres PE ($3652,6 \pm 1364,0$; B), eine geringere WiAUC ($32089,9 \pm 14842,2$; C), eine geringere WiR ($600,4 \pm 172,2$; D) und ein geringerer WiPI ($2556,7 \pm 960,5$; E), im Vergleich zur Kontrollgruppe (HIF-NIS-MSC + NaCl; PE: $9281,9 \pm 674,0$; WiAUC: $86506,3 \pm 7779,2$; WiR: $1269,1$

$\pm 106,0$; WiPI: $6315,4 \pm 342,3$; A-E), beobachtet werden. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte und Standardfehler aus den einzelnen Tieren einer Gruppe gezeigt (* $p < 0,05$). A.u., *arbitrary unit*.

In einem anschließenden Versuch wurden die Tumorzellproliferation und die Blutgefäßdichte nach der Hypoxie-induzierten, NIS-vermittelten Radioiodtherapie immunhistochemisch untersucht. Für die Analyse der Tumorzellproliferation wurde der Anteil an Ki67-positiven Zellen im Tumor bestimmt und zur Analyse der Tumorperfusion die CD31-positive Fläche im Tumor ermittelt. Durch die immunhistochemischen Analysen konnten eine geringere Tumorzellproliferation und eine geringere Blutgefäßdichte in der Therapiegruppe (HIF-NIS-MSC + ^{131}I ; Ki67: $47,6 \pm 5,0\%$; CD31: $3,0 \pm 0,5\%$; Abb. 23 A, D, E), im Vergleich zu den Kontrollgruppen (Ki67: HIF-NIS-MSC + NaCl: $68,7 \pm 2,5\%$; WT-MSC + ^{131}I : $65,2 \pm 9,0\%$; CD31: HIF-NIS-MSC + NaCl: $6,6 \pm 0,5\%$; WT-MSC + ^{131}I : $6,9 \pm 1,6\%$; Abb. 23 B-E), beobachtet werden. Die geringere Tumorzellproliferation in der Therapiegruppe korreliert mit dem verminderten Tumorwachstum und die geringe Blutgefäßdichte im Tumor mit der geringeren Tumorperfusion während der Therapiestudie, im Vergleich zu den Kontrollgruppen.

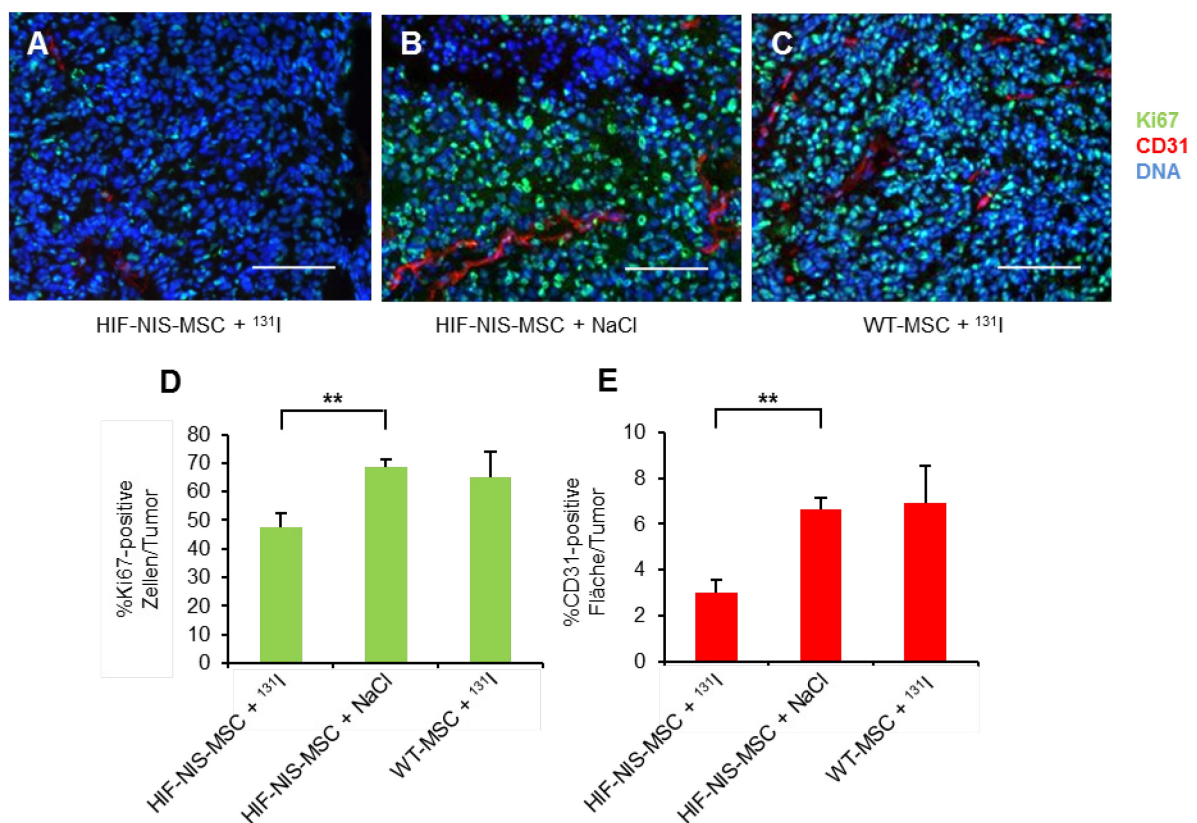


Abb. 23: Geringere Tumorzellproliferation und Blutgefäßdichte im Tumor, nach HIF-NIS-MSC-vermittelter ^{131}I -Aufnahme in den Tumor eines orthotopen HuH7 Xenograftmausmodells. Die Radioiodtherapie der HIF-NIS-MSC-behandelten Mäuse führte zu einer signifikant geringeren Tumorzellproliferation und einer signifikant geringeren Blutgefäßdichte in der Therapiegruppe (HIF-NIS-MSC + ^{131}I ; Ki67: $47,6 \pm 5,0\%$; CD31: $3,0 \pm 0,5\%$; A, D, E), im Vergleich zu den Kontrollgruppen (Ki67: HIF-NIS-MSC + NaCl: $68,7 \pm 2,5\%$; WT-MSC + ^{131}I : $65,2 \pm 9,0\%$; CD31: HIF-NIS-MSC + NaCl: $6,6 \pm 0,5\%$; WT-MSC + ^{131}I : $6,9 \pm 1,6\%$; B-E). Dargestellt ist eine repräsentative Färbung. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte und Standardfehler aus den einzelnen Tieren einer Gruppe gezeigt (** $p < 0,01$). Maßstab = 100 μm .

3.4 3-dimensionale Analyse der Tumervaskularisierung und der MSC-Rekrutierung in das Tumorstroma

In den vorangegangenen Experimenten wurde gezeigt, dass die HIF-NIS-MSCs in das Tumorstroma von subkutanen und orthotopen Tumoren rekrutiert werden und, dass diese in den hypoxischen Arealen NIS exprimieren. Ein Vergleich des subkutanen und orthotopen Tumormodells zeigte, dass sowohl die MSC-Rekrutierung in das Tumorstroma als auch die Hypoxie-induzierte NIS-Expression entscheidend für den Erfolg der NIS-basierten Radioiodtherapie sind. Bisher wurden die MSC-Rekrutierung und die NIS-Expression neben der nicht-invasiven bildgebenden Darstellung *in vivo*, mittels ^{123}I -Szintigraphie und ^{124}I -/ ^{18}F -TFB-PET, 2-dimensional auf Tumorschnitten nach einer immunhistochemischen Färbung oder Immunfluoreszenzfärbung analysiert. Allerdings kann durch diese 2-dimensionale Analyse weder die Tumervaskularisierung noch die MSC-Verteilung im Tumor, v.a. auch in Bezug auf die Distanz der MSCs zu den Blutgefäßen, adäquat analysiert werden. Somit war das Ziel einer weiterführenden Studie die Evaluierung einer Methode, welche eine 3-dimensionale Analyse der Tumervaskularisierung und der MSC-Verteilung in den orthotopen HuH7 Tumoren ermöglicht. Um die MSCs im Tumor detektieren zu können, wurden diese vor der intravenösen Applikation mit dem Farbstoff CellTracker™ Deep Red zytoplasmatisch markiert. In dieser Studie wurden die CMV-NIS-MSCs verwendet, denn diese ermöglichen einen direkten Vergleich der Signale des CellTracker™ Deep Red aus der 3-dimensionalen Darstellung durch die 3D-Lichtblattfluoreszenzmikroskopie mit der 2-dimensionalen Darstellung der NIS-Expression auf Tumorschnitten nach einer Antikörperfärbung und somit eine Evaluierung des Potenzials dieser Methode. Die CMV-NIS-MSCs wurden 3 Wochen nach der intrahepatischen Tumorzellinjektion drei Mal in einem Abstand von zwei Tagen intravenös über die Schwanzvene appliziert. Für die Darstellung der Tumervaskularisierung wurde den Mäusen intravenös Lektin markiert mit dem VivoTag®-S 750 Fluorochrom injiziert. Dieses bindet an die luminale Oberfläche der Endothelzellen und ermöglicht dadurch eine mikroskopische Darstellung der Blutgefäße.

Zu Beginn wurde, um eine Vorstellung über das Wachstum des orthotopen Tumors in der Leber zu erhalten, die Struktur des Tumors 3-dimensional dargestellt. Durch diese Aufnahmen konnte gezeigt werden, dass sich dieser während des Wachstums sowohl im Leberlappen ausbreitet als auch aus der Leber herauswächst (Abb. 24).

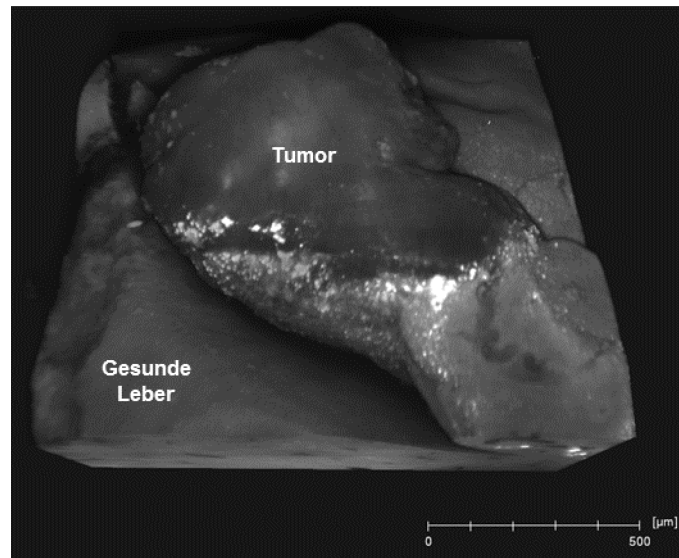


Abb. 24: 3-Dimensionale Darstellung des Wachstums des orthotopen HuH7 Tumors. Durch eine 3D-Lichtblattfluoreszenzmikroskopie des orthotopen HuH7 Tumors ($n = 1$) konnte gezeigt werden, dass sich dieser sowohl durch das Lebergewebe zieht als auch aus diesem herauswächst. Dargestellt ist eine repräsentative 3D-Lichtblattfluoreszenzmikroskopie-Aufnahme. (Autofluoreszenz: Cy3 Filter: Extinktion: 531/40 nm und Emission: 593/40 nm). Maßstab = 500 μm ; Gewebsdicke: 700 μm .

Anschließend wurde die Tumervaskularisierung anhand des Lektins markiert mit dem VivoTag®-S 750 Fluorochrom und die MSC-Verteilung durch den CellTracker™ Deep Red 3-dimensional analysiert. Hierbei konnte gezeigt werden, dass der orthotope Tumor eine stark veränderte Vaskularisierung, im Vergleich zu dem gesunden Lebergewebe, aufweist. Im orthotopen Tumor konnten sehr große prominente Gefäße beobachtet werden, wohingegen das gesunde Lebergewebe eine fein strukturierte Mikrovaskularisierung zeigt. Zudem nimmt die Blutgefäßdichte des orthotopen Tumors mit zunehmender Distanz zur Leber ab, wodurch dieser einen Kern mit einer geringeren Blutgefäßdichte aufweist. Die CMV-NIS-MSCs sind in hoher Anzahl in das Tumorstroma rekrutiert worden und in *Clustern* innerhalb des Tumors verteilt. Ein großer Anteil der MSCs befindet sich in dem geringer durchbluteten, hypoxischen Zentrum des Tumors. Im gesunden Lebergewebe wurde, aufgrund der hohen Vaskularisierung, ein starkes Signal des markierten Lektins detektiert. Ein CellTracker™ Deep Red Signal von den MSCs konnte hier nicht beobachtet werden (Abb. 25).

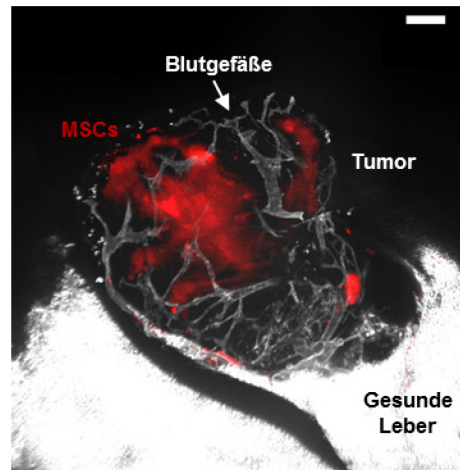


Abb. 25: 3-Dimensionale Darstellung der Vaskularisierung und MSC-Verteilung im orthotopen HuH7 Tumor.

Die Analyse der Tumervaskularisierung des orthotopen Tumors ($n = 1$) zeigte, dass die Blutgefäßdichte mit zunehmender Distanz zu dem Lebergewebe abnimmt und das Zentrum des Tumors eine geringere Blutgefäßdichte aufweist. Die CMV-NIS-MSCs wurden nach der intravenösen Injektion in hoher Anzahl in das Tumorstroma rekrutiert und sind dort in *Clustern* lokalisiert. Ein großer Teil der CMV-NIS-MSCs ist in das weniger durchblutete, hypoxische Zentrum migriert. Dargestellt ist eine Maximalprojektion über 100 μm (CellTracker™ Deep Red Farbstoff: Cy5 Filter: Extinktion: 640/30 nm und Emission: 690/50 nm; VivoTag®-S 750 Fluorochrom: Cy7 Filter: Extinktion 740/35 nm und Emission 795/50 nm). Maßstab = 100 μm .

Zur Validierung dieser 3-dimensionalen Analyse wurde daraufhin die MSC-Rekrutierung in das Tumorstroma mit einer 2-dimensionalen Analyse der NIS-Expression auf Tumorschnitten nach einer Immunfluoreszenzfärbung dieses Tumors korreliert. Hierfür wurde aus der 3-dimensionalen Darstellung die Schnittfläche gesucht, welche für die NIS Immunfluoreszenzfärbung gewählt wurde. Es konnte gezeigt werden, dass die Signale des CellTracker™ Deep Red von den MSCs aus der 3-dimensionalen Analyse und die Signale des Alexa488 von der NIS-Expression aus der 2-dimensionalen Analyse überlagert werden können (Abb. 26 A, B). Eine NIS-Expression konnte sowohl im Zytoplasma als auch an der Zellmembran der CMV-NIS-MSCs beobachtet werden (Abb. 26 C-E). Im gesunden Lebergewebe konnten weder CellTracker™ Deep Red Signale von den MSCs noch Alexa488 Signale von der NIS-Expression detektiert werden.

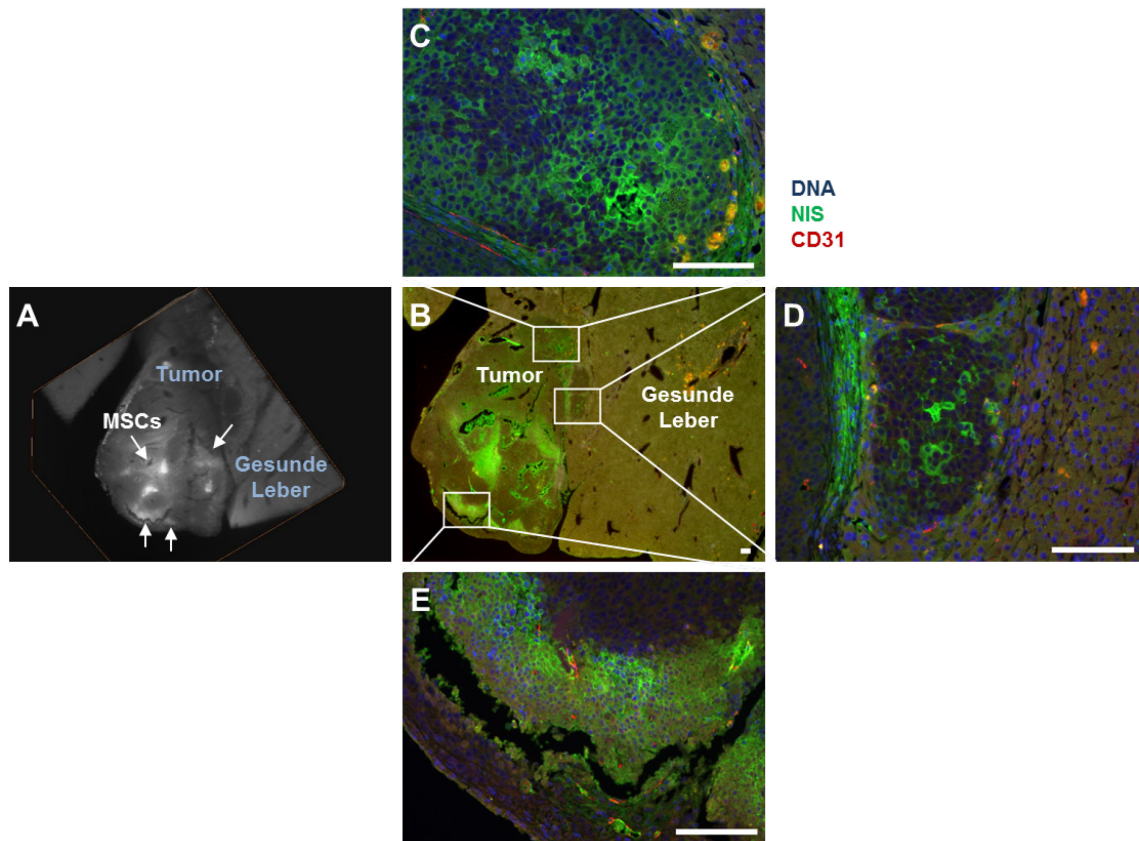


Abb. 26: Korrelation der MSC-Signale aus der 3D-Lichtblattfluoreszenzmikroskopie mit der NIS-Expression aus der 2-dimensionalen Fluoreszenzmikroskopie. Die Signale des CellTracker™ Deep Red von den MSCs aus der 3-dimensionalen Analyse durch die 3D-Lichtblattfluoreszenzmikroskopie (A) und die Signale des Alexa488 von der NIS-Expression aus der 2-dimensionalen Analyse durch Fluoreszenzmikroskopie (B) konnten korreliert werden. Eine NIS-Expression war sowohl im Zytoplasma wie auch an der Zellmembran der CMV-NIS-MSCs sichtbar (C-E). Gezeigt sind eine repräsentative Aufnahme einer Schnittfläche des orthotopen Tumors aus der 3D-Lichtblattfluoreszenzmikroskopie und eine NIS-Fluoreszenzfärbung dieser Schnittfläche. Maßstab = 100 µm.

3.5 Analyse der Effekte von Schilddrüsenhormonen auf das Hypoxie-responsive Netzwerk in MSCs

In den vorangegangenen Untersuchungen konnte das Potenzial eines HRP für eine NIS-vermittelte ^{131}I -Therapie zur Behandlung orthotoper Leberkarzinome gezeigt werden. Für die Aktivierung des HRP spielt die Konzentration an HIF-1 eine ausschlaggebende Rolle, denn dieses bindet an die Hypoxie-responsiven Elemente in der Promoterregion und kann nachfolgend die NIS-Expression einleiten. In den letzten Jahren hat sich gezeigt, dass die Schilddrüsenhormone T3 und T4 durch genomische und nicht-genomische Effekte die Formation des Tumorstromas wesentlich beeinflussen können. Viele dieser Schilddrüsenhormon-induzierten Effekte beruhen auf der Induktion der HIF-1 α -Expression und der damit verbundenen verstärkten Expression verschiedener Hypoxie-responsiver Gene. Da eine erhöhte Expression von HIF-1 α die Hypoxie-induzierte, NIS-

vermittelte ^{131}I -Therapie stimulieren kann, wurden in einer weiterführenden Studie die Schilddrüsenhormon-induzierten Effekte auf das Hypoxie-responsive Netzwerk in MSCs untersucht. Zu Beginn wurden die Effekte der Schilddrüsenhormone T3 und T4 auf die HIF-1 α -Expression in MSCs auf mRNA-Ebene analysiert. Hierfür wurden diese für 24 h mit 20% cHuH7M alleine (unstimulierte MSCs) oder zusammen mit T3 oder T4 stimuliert und die HIF-1 α -Expression durch eine qRT-PCR ermittelt. Das cHuH7M wurde zugesetzt, um das Tumormilieu zu simulieren und so dessen Einfluss auf die T3- bzw. T4-vermittelten Effekte in MSCs einschätzen zu können. Eine Stimulation der MSCs mit T3 führte zu einer 2,35-fach höheren und mit T4 zu einer 3,49-fach höheren HIF-1 α -Expression in Gegenwart von 20% cHuH7M, im Vergleich zu unstimulierten MSCs. Um zu überprüfen, ob diese Effekte Integrin $\alpha\beta 3$ -vermittelt sind, wurde ein Teil der MSCs mit dem Integrin $\alpha\beta 3$ -spezifischen Inhibitor Tetrac behandelt. Durch Tetrac konnte die T3- bzw. T4-induzierte HIF-1 α -Expression gehemmt werden (Abb. 27).

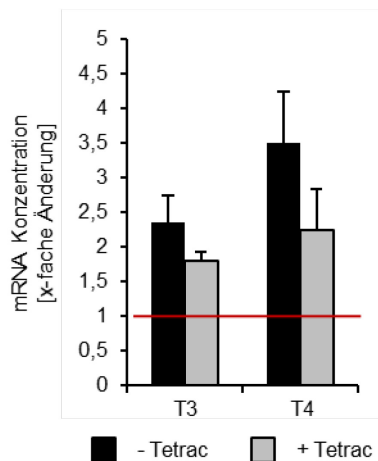


Abb. 27: T3- bzw. T4-induzierte, Tetrac-abhängige HIF-1 α -Expression. Durch Stimulation von MSCs für 24 h mit T3 oder T4 konnte, im Vergleich zu unstimulierten MSCs, eine höhere HIF-1 α -Expression in Gegenwart von 20% cHuH7M beobachtet werden (T3: 2,35-fach und T4: 3,49-fach), welche durch den Integrin $\alpha\beta 3$ -spezifischen Inhibitor Tetrac stark vermindert werden konnte. Die Ergebnisse sind als durchschnittliche x-fache Änderung, bezogen auf unstimulierte MSCs (rote Linie), und Standardfehler aus zwei Wiederholungen gezeigt.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass T3 und T4 in Gegenwart von 20% cHuH7M die HIF-1 α -Expression verstärken können, wurde anschließend der Effekt der Schilddrüsenhormone T3 und T4 auf die Expression der HIF-1-responsiven Gene *GLUT1*, *PFKP*, *MCT4* und *STC1* in MSCs auf mRNA-Ebene analysiert. Diese Gene spielen eine wichtige Rolle im Calcium- und Phosphatmetabolismus (*STC1*/Stanniocalcin-1), bei der Glukoseaufnahme (*GLUT1*/GLUT-1), der Glykolyse (*PFKP*/PFK-P) sowie dem Lactatexport (*MCT4*/MCT 4). Eine Stimulation der MSCs mit T3 oder T4 führte in Gegenwart von 20% cHuH7M zu einer gesteigerten, Tetrac-abhängigen Expression von *STC1* (T3: 1,39-fach und T4: 1,47-fach), *GLUT1* (T3: 1,21-fach und T4: 1,04-fach), *PFKP* (T3: 1,38-fach und T4:

1,34-fach) und *MCT4* (T3: 1,55-fach und T4: 1,74-fach), im Vergleich zu unstimulierten MSCs (Abb. 28).

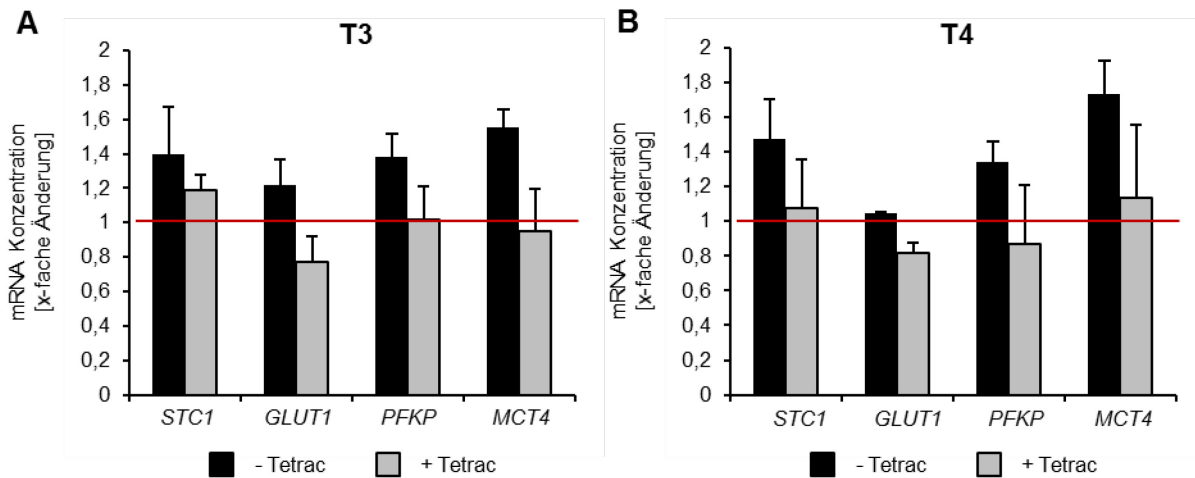


Abb. 28: T3- bzw. T4-induzierte, Tetrac-abhängige Expression der HIF-1-responsiven Gene *STC1*, *GLUT1*, *PFKP* und *MCT4*. Durch Stimulation von MSCs mit T3 (A) oder T4 (B) in Gegenwart von 20% cHuH7M für 24 h konnte eine gesteigerte Expression von *STC1* (T3: 1,39-fach und T4: 1,47-fach), *GLUT1* (T3: 1,21-fach und T4: 1,04-fach), *PFKP* (T3: 1,38-fach und T4: 1,34-fach) und *MCT4* (T3: 1,55-fach und T4: 1,74-fach) induziert werden, welche wiederum durch Tetrac vermindert werden konnte. Die Ergebnisse sind als durchschnittliche x-fache Änderung, bezogen auf unstimulierte MSCs (rote Linie), und Standardfehler aus zwei Wiederholungen dargestellt.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Schilddrüsenhormone T3 und T4 das Hypoxie-responsive Netzwerk in MSCs in Gegenwart von 20% cHuH7M beeinflussen können, wurde daraufhin die Induktion des HRP durch T3 und T4 in den HIF-NIS-MSCs untersucht. Hierfür wurden diese für 24 h mit 20% cHuH7M und CoCl_2 alleine (unstimulierte HIF-NIS-MSCs) oder zusammen mit T3 oder T4 (mit oder ohne Tetrac) stimuliert sowie die HIF-1-induzierte, NIS-vermittelte ^{125}I -Aufnahme durch einen ^{125}I -Uptake Assay ermittelt. Das CoCl_2 wurde zugesetzt, um eine Hypoxie zu simulieren, da es den Abbau, des durch die Schilddrüsenhormone exprimierten HIF-1 α , durch Inaktivierung der PHDs, verhindert (Yuan *et al.*, 2003). Andernfalls würden die PHDs den Abbau des HIF-1 α Proteins einleiten und es würde kein HIF-1 Komplex gebildet werden. Die Stimulation der HIF-NIS-MSCs mit T3 führte zu einer 1,19-fachen Steigerung und mit T4 zu einer 1,24-fachen Steigerung der ^{125}I -Aufnahme in Gegenwart von 20% cHuH7M und CoCl_2 , im Vergleich zu unstimulierten HIF-NIS-MSCs. Diese T3- bzw. T4-induzierten Effekte auf die Hypoxie-induzierte, NIS-vermittelte ^{125}I -Aufnahme konnten durch Tetrac gesenkt werden. Um zu verifizieren, dass die ^{125}I -Aufnahme NIS-vermittelt ist, wurde ein Teil der HIF-NIS-MSCs zusätzlich mit dem NIS-spezifischen Inhibitor Perchlorat behandelt. Die ^{125}I -Aufnahme konnte durch Perchlorat stark vermindert werden (Abb. 29).

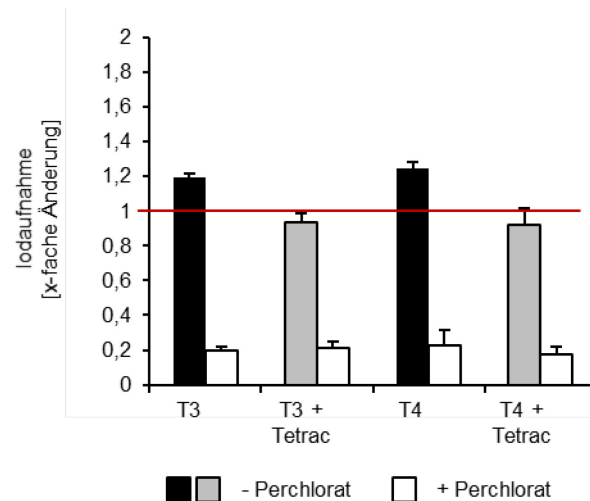


Abb. 29: T3- bzw. T4-induzierte, NIS-vermittelte ^{125}I -Aufnahme in HIF-NIS-MSCs in Gegenwart von 20% cHuH7M. Durch Stimulation der HIF-NIS-MSCs für 24 h mit T3 oder T4 konnte eine höhere, Tetrac- und Perchlorat-abhängige, HIF-1-induzierte, NIS-vermittelte ^{125}I -Aufnahme in Gegenwart von 20% cHuH7M und CoCl_2 erzielt werden (T3: 1,19-fach und T4: 1,24-fach), im Vergleich zu unstimulierten HIF-NIS-MSCs. Die Ergebnisse sind als durchschnittliche x-fache Änderung, bezogen auf unstimulierte HIF-NIS-MSCs (rote Linie), und Standardfehler aus zwei Wiederholungen dargestellt.

Anschließend wurde der Effekt der Schilddrüsenhormone T3 und T4 auf die HIF-1-induzierte, NIS-vermittelte ^{125}I -Aufnahme nach einer Stimulation der HIF-NIS-MSC mit T3 oder T4 auch in Gegenwart von 100% cHuH7M und CoCl_2 evaluiert. Die HIF-NIS-MSCs wurden dafür für 24 h mit 100% cHuH7M und CoCl_2 alleine (unstimulierte HIF-NIS-MSCs) oder zusammen mit T3 oder T4 (mit oder ohne Tetrac) stimuliert und die HIF-1-induzierte, NIS-vermittelte ^{125}I -Aufnahme durch einen ^{125}I -Uptake Assay analysiert. In Gegenwart von 100% cHuH7M und CoCl_2 konnte eine 1,26-fach höhere, Tetrac- und Perchlorat-abhängige, HIF-1-induzierte, NIS-vermittelte ^{125}I -Aufnahme durch T3 und eine 1,58-fach höhere, Tetrac- und Perchlorat-abhängige, HIF-1-induzierte, NIS-vermittelte ^{125}I -Aufnahme durch T4, bezogen auf unstimulierte HIF-NIS-MSCs, beobachtet werden. Somit konnten in Gegenwart von 100% cHuH7M und CoCl_2 die T3- bzw. T4-induzierten Effekte auf die NIS-vermittelte ^{125}I -Aufnahme, im Vergleich zu 20% cHuH7M und CoCl_2 , weiter gesteigert werden (Abb. 30).

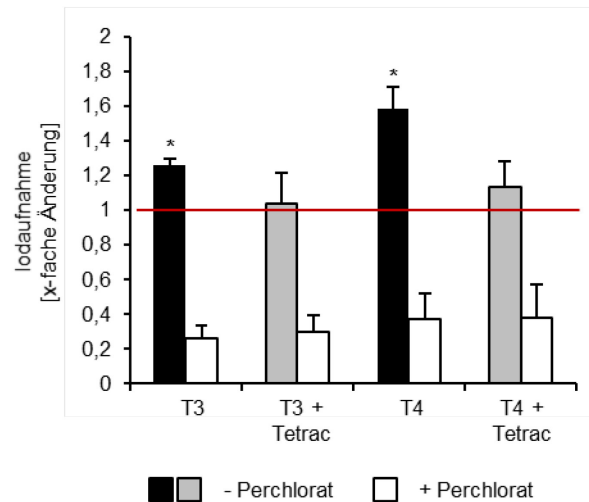


Abb. 30: T3- bzw. T4-induzierte, NIS-vermittelte ^{125}I -Aufnahme in HIF-NIS-MSCs in Gegenwart von 100% cHuH7M. Eine Stimulation der HIF-NIS-MSCs für 24 h mit T3 oder T4 führte zu einer höheren, Tetrac- und Perchlorat-abhängigen, HIF-1-induzierten, NIS-vermittelten ^{125}I -Aufnahme in Gegenwart von 100% cHuH7M und CoCl_2 (T3: 1,26-fach und T4: 1,58-fach). Somit konnten die T3- bzw. T4-induzierten Effekte auf die HIF-1 α -Expression durch 100% cHuH7M, im Vergleich zu 20% cHuH7M, weiter gesteigert werden. Die Daten sind als durchschnittliche x-fache Änderung, bezogen auf unstimulierte HIF-NIS-MSCs (rote Linie), und Standardfehler aus drei Wiederholungen gezeigt (* $p < 0,05$).

Um nochmals zu verifizieren, dass diese HIF-1-induzierte, NIS-vermittelte ^{125}I -Aufnahme in HIF-NIS-MSCs Integrin $\alpha\beta 3$ -vermittelt ist, wurde neben der Verwendung des Integrin $\alpha\beta 3$ -spezifischen Inhibitors Tetrac der Effekt der Schilddrüsenhormone T3 und T4 auf die HIF-1-induzierte, NIS-vermittelte ^{125}I -Aufnahme zusätzlich in Integrin $\alpha\beta 3$ -negativen HuH7 getestet. Diese wurden zur Generierung der HIF-NIS-HuH7 mit dem pGL3-HIF-NIS Konstrukt transfiziert und die Induzierbarkeit des HRP in den HIF-NIS-HuH7 unter hypoxischen Bedingungen in einem funktionalen Versuch durch die Analyse der NIS-vermittelten ^{125}I -Aufnahme von HuH7, unstimulierten HIF-NIS-HuH7 und von HIF-NIS-HuH7, welche für 24 h mit 100 μM des Hypoxie-simulierenden Reagenz CoCl_2 stimuliert wurden, überprüft. Sowohl HuH7 als auch unstimulierte HIF-NIS-HuH7 zeigten keine spezifische ^{125}I -Aufnahme, wohingegen eine Stimulation der HIF-NIS-HuH7 mit 100 μM CoCl_2 zu einer signifikanten Steigerung der ^{125}I -Aufnahme führte. Die ^{125}I -Aufnahme von stimulierten HIF-NIS-HuH7 war um das 6,36-fache höher, im Vergleich zu unstimulierten HIF-NIS-HuH7, und konnte durch den NIS-spezifischen Inhibitor Perchlorat stark vermindert werden (Abb. 31).

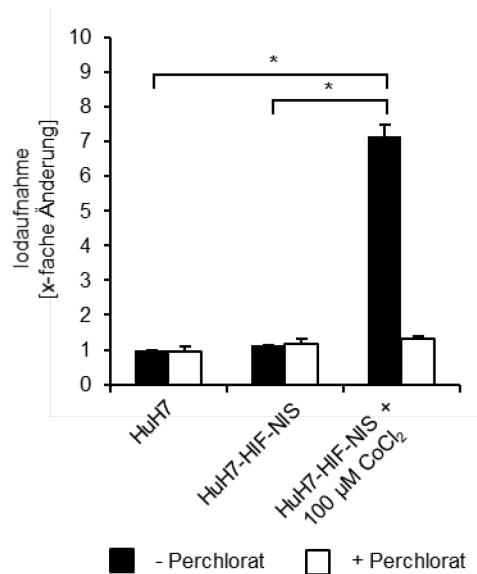


Abb. 31: NIS-vermittelte ^{125}I -Aufnahme in HIF-NIS-HuH7 nach CoCl_2 Stimulation. Durch eine Stimulation der HIF-NIS-HuH7 mit $100\ \mu\text{M}$ CoCl_2 konnte eine 6,36-fach höhere, Perchlorat-abhängige, NIS-vermittelte ^{125}I -Aufnahme, im Vergleich zu unstimulierten HIF-NIS-HuH7, erzielt werden. Die HuH7 und die unstimulierten HIF-NIS-HuH7 zeigten keine ^{125}I -Aufnahme über das Hintergrundsignal hinaus. Die Daten sind als durchschnittliche x-fache Änderung, bezogen auf HuH7, und Standardfehler aus zwei Wiederholungen gezeigt (* $p < 0,05$).

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die NIS-vermittelte ^{125}I -Aufnahme in den HIF-NIS-HuH7 unter hypoxischen Bedingungen durch HIF-1 induziert werden kann, wurden anschließend die Effekte der Schilddrüsenhormone T3 und T4 auf die NIS-vermittelte ^{125}I -Aufnahme untersucht. Hierfür wurden die HIF-NIS-HuH7 für 24 h mit CoCl_2 alleine (unstimulierte HIF-NIS-HuH7) oder zusätzlich mit T3 oder T4 (mit oder ohne Tetrac) stimuliert und die HIF-1-induzierte, NIS-vermittelte ^{125}I -Aufnahme über einen ^{125}I -Uptake Assay ermittelt. Weder eine Stimulation der HIF-NIS-HuH7 mit T3 noch T4 verstärkte die ^{125}I -Aufnahme, im Vergleich zu unstimulierten HIF-NIS-HuH7 (Abb. 32).

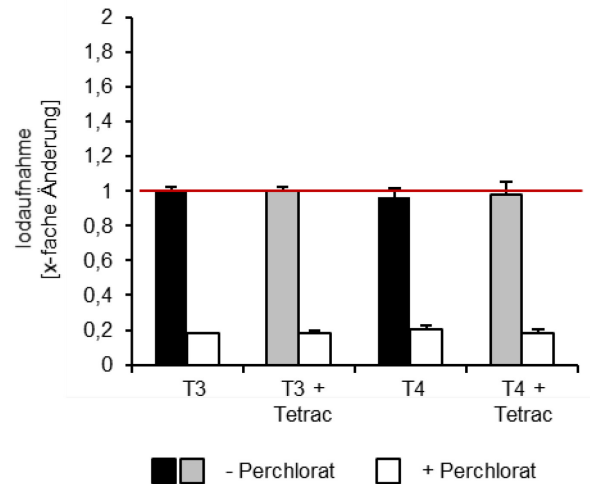


Abb. 32: Keine T3- bzw. T4-induzierte, NIS-vermittelte ^{125}I -Aufnahme in Integrin $\alpha\beta 3$ -negative HIF-NIS-HuH7. Durch eine Stimulation der Integrin $\alpha\beta 3$ -negativen HIF-NIS-HuH7 mit T3 oder T4 in Gegenwart von CoCl_2 für 24 h konnte keine HIF-1-induzierte, NIS-vermittelte ^{125}I -Aufnahme erzielt werden. Die Daten sind als durchschnittliche x-fache Änderung, bezogen auf unstimulierte HIF-NIS-HuH7 (rote Linie), und Standardfehler aus zwei Wiederholungen gezeigt.

Für die Schilddrüsenhormon-induzierte, nicht-genomische, Integrin $\alpha\beta 3$ -vermittelte Induktion der HIF-1 α -Expression wurden zwei verschiedene Signalwege ausgehend von Integrin $\alpha\beta 3$ beschrieben. So kann T3 die HIF-1 α -Expression über den PI3K Signalweg und T4 über den ERK1/2 Signalweg einleiten (Moeller & Broecker-Preuss, 2011). Um zu überprüfen, ob durch diese Signalwege auch die HIF-1 α -Expression in den HIF-NIS-MSCs eingeleitet wird, wurde ein Teil der HIF-NIS-MSCs, nach einer Stimulation mit T3 oder T4 in Gegenwart von 100% cHuH7M und CoCl_2 , zusätzlich mit einem Inhibitor des PI3K (LY294002) und des ERK1/2 Signalwegs (RAF265) behandelt. Der Inhibitor des PI3K Signalwegs LY294002 konnte die T3-induzierte und der Inhibitor des ERK1/2 Signalwegs RAF265 die T3- und T4-induzierte HIF-1 α -Expression signifikant hemmen (Abb. 33).

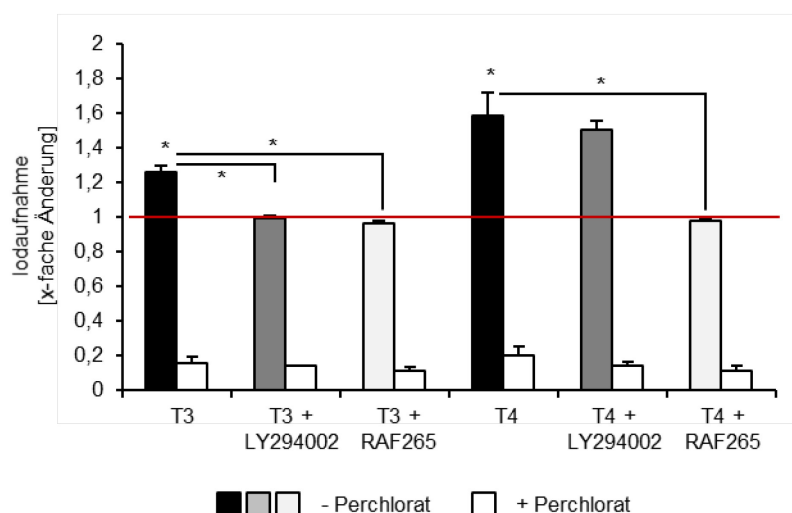


Abb. 33: Inhibition der T3- bzw. T4-induzierten, NIS-vermittelten ^{125}I -Aufnahme in HIF-NIS-MSCs durch Inhibitoren des PI3K und des ERK1/2 Signalwegs. Die T3-induzierten Effekte auf die NIS-vermittelte ^{125}I -Aufnahme in Gegenwart von 100% cHuH7M und CoCl_2 konnten durch LY294002, einem Inhibitor des PI3K Signalwegs, und RAF265, einem Inhibitor des ERK1/2 Signalwegs, stark vermindert werden. Die T4-induzierten Effekte auf die NIS-vermittelte ^{125}I -Aufnahme in Gegenwart von 100% cHuH7M und CoCl_2 konnten durch RAF265 deutlich gesenkt werden. Die Ergebnisse sind als durchschnittliche x-fache Änderung, bezogen auf unstimulierte HIF-NIS-MSCs (rote Linie), und Standardfehler aus zwei Wiederholungen gezeigt (* $p < 0,05$).

3.6 Entwicklung eines Protokolls zur Radioiodablation der Mausschilddrüse

In den vorangegangenen Analysen konnte gezeigt werden, dass die Schilddrüsenhormone T3 und T4 über das Integrin $\alpha\beta 3$ die HIF-1 α -Expression in MSCs steigern können und der Schilddrüsenhormonmetabolit Tetrac diese T3- bzw. T4-induzierte HIF-1 α -Expression senken kann. Um diese Effekte auch *in vivo* analysieren zu können, ist die Generierung eines athyreoten Tiermodells von großer Bedeutung, denn in diesem kann die NIS-vermittelte, und mit dem Schilddrüsenhormonstatus variierende, Radionuklidakkumulation in die Schilddrüse eliminiert werden, was eine Verwendung von NIS als Reportergen ermöglicht. Darauf basierend wurde in dieser Studie ein Protokoll entwickelt, durch welches die Mausschilddrüse mit Hilfe von Radioiod ablatiert werden kann. Diese Studie wurde in Zusammenarbeit mit Kathrin Schmohl (Medizinische Klinik und Poliklinik II, Klinikum der Universität München, München, Deutschland) durchgeführt. Zu Beginn wurde ein Protokoll getestet, welches von Gorbman entwickelt wurde (Gorbman, 1947). Bei dieser Schilddrüsenablationsstrategie wurden die Mäuse eine Woche vor der Ablation auf eine LID gesetzt und anschließend die Schilddrüse mit 18,5 MBq ^{131}I ablatiert. Durch die LID kann eine gesteigerte NIS-Expression in den Schilddrüsenfollikelzellen ermöglicht werden, was zu einer gesteigerten Radioiodaufnahme in die Schilddrüse führt. Die Mäuse zeigten allerdings bei dieser Ablationsstrategie, 1-2 Wochen nach der Ablation, einen starken Gewichtsverlust und Atemprobleme, weswegen sie schon bald euthanasiert werden mussten (Abb. 34).

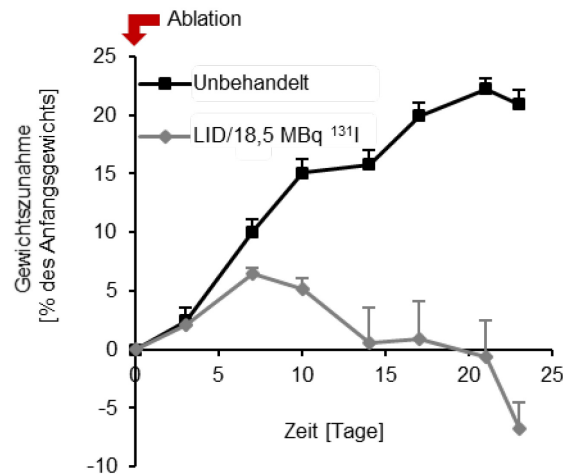


Abb. 34: Starker Gewichtsverlust und Atemprobleme nach einer Schilddrüsenablation mit einer LID und 18,5 MBq ¹³¹I. Nach der Schilddrüsenablation mit einer LID und 18,5 MBq ¹³¹I zeigten die Schilddrüsen-ablatierten Mäuse (n = 6) schon nach 1-2 Wochen einen starken Gewichtsverlust und Atemschwierigkeiten, weshalb sie innerhalb kürzester Zeit euthanasiert werden mussten, im Gegensatz zu den Kontrolltieren (n = 6), welche ein konstantes Wachstum aufwiesen. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte und Standardfehler aus den einzelnen Tieren einer Gruppe dargestellt.

Um die ¹³¹I-Dosis senken zu können und so die toxischen Effekte zu minimieren, wurde daraufhin ein Protokoll getestet, bei welchem die ¹³¹I-Aufnahme in die Schilddrüsenfollikelzellen stärker stimuliert wird. Das Protokoll wurde anhand von Studien von Abel *et al.* (Abel *et al.*, 1999) und Barca-Mayo *et al.* (Barca-Mayo *et al.*, 2011) entworfen. Bei diesen Studien wurde die ¹³¹I-Menge auf 5,5 MBq gesenkt, aber gleichzeitig, um eine hohe Radioiodaufnahme in die Schilddrüse zu erzielen, wurden die Mäuse vor der Radioiodapplikation nicht nur auf eine LID gesetzt, sondern ihnen wurde auch bovines TSH appliziert. Bei dieser Schilddrüsenablationsstrategie lag der T4-Gehalt im Mausblut/Mausserum 10 Wochen nach der Ablation auf einem Level unterhalb des Detektionslimits, wohingegen die unbehandelten Kontrollmäuse einen T4-Gehalt von $44,7 \pm 2,6$ nM zeigten (Abb. 35 A). Durch den niedrigen T4-Gehalt im Mausblut/Mausserum der Schilddrüsen-ablatierten Mäuse wurde gleichzeitig die TSH β -Expression in der Hypophyse um das ~44,7-fache gesteigert, bezogen auf die unbehandelten Kontrolltiere (Abb. 35 B).

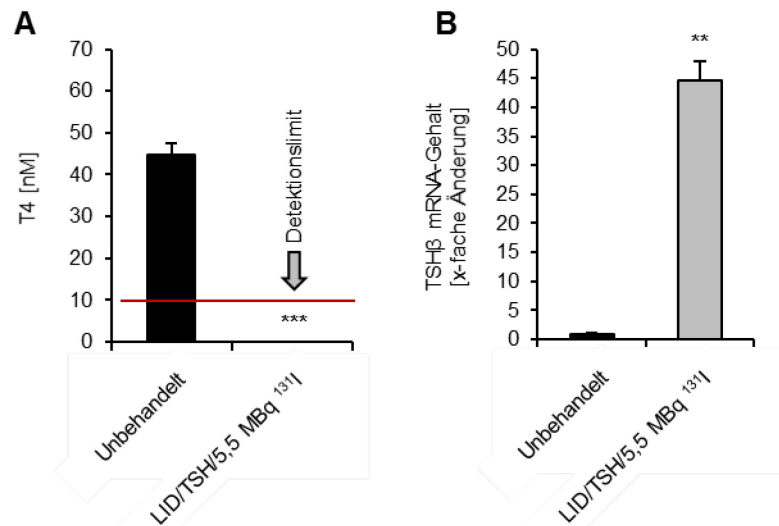


Abb. 35: Reduktion des T4-Gehalts im Mausblut/Mausserum auf ein Level unterhalb des Detektionslimits und Steigerung der TSHβ-Expression in der Maushypophyse durch eine Schilddrüsenablation mit einer LID, TSH und 5,5 MBq ¹³¹I. Durch eine Schilddrüsenablation mit einer LID, TSH und 5,5 MBq ¹³¹I konnte der T4-Gehalt im Mausblut/Mausserum bei den Schilddrüse-ablatierten Mäusen (n = 6) 10 Wochen nach der Ablation auf ein Level unterhalb des Detektionslimits gesenkt werden, im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren (n = 6), welche einen T4-Gehalt von $44,7 \pm 2,6$ nM aufwiesen (A). Gleichzeitig konnte die TSHβ-Expression in den Hypophysen der Schilddrüse-ablatierten Mäusen (n = 3) ~44,7-fach gesteigert werden, bezogen auf unbehandelte Kontrolltiere (B; n = 6). Die Ergebnisse sind als Mittelwerte und Standardfehler aus den einzelnen Tieren einer Gruppe für die T4-Konzentration und als durchschnittliche x-fache Änderung und Standardfehler aus den einzelnen Tieren einer Gruppe für den TSHβ-mRNA-Gehalt dargestellt (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Um den Erfolg der Schilddrüsenablation weiter zu festigen, wurde anschließend das Vorhandensein von Restschilddrüsengewebe bildgebend analysiert. Hierfür wurde den Mäusen 10 Wochen nach der Ablation 18,5 MBq ^{99m}Tc-Pertechnetat appliziert und die Radionuklidaufnahme in die Schilddrüse durch eine ^{99m}Tc-Pertechnetat-Szintigraphie ermittelt. Die unbehandelten Kontrollmäuse zeigten eine ^{99m}Tc-Pertechnetat-Aufnahme von 35-40% ID/Organ in der Halsregion, wohingegen die Schilddrüse-ablatierten Mäuse lediglich eine ^{99m}Tc-Pertechnetat-Aufnahme von 2-6% zeigten (Abb. 36). Die ^{99m}Tc-Pertechnetat-Aufnahme in der Halsregion stammt von den Speicheldrüsen, welche in direkter Nachbarschaft zu der Schilddrüse lokalisiert sind und NIS exprimieren (Antonica *et al.*, 2012; Spitzweg, Joba, Schriever, *et al.*, 1999).

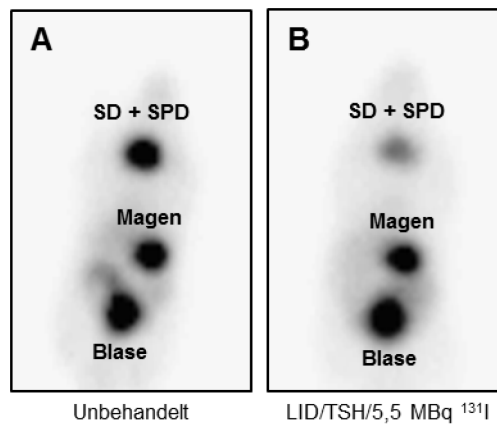


Abb. 36: Elimination der thyreoidalen Radionuklidaufnahme nach einer Schilddrüsenablation mit einer LID, TSH und 5,5 MBq ¹³¹I. Die Schilddrüsenablation mit einer LID, TSH und 5,5 MBq ¹³¹I senkte die ^{99m}Tc-Pertechnetat-Aufnahme im Halsbereich auf 2-6% bei den Schilddrüse-ablatierten Mäusen (B; n = 4), im Vergleich zu den Kontrolltieren (A; n = 4), welche eine ^{99m}Tc-Pertechnetat-Aufnahme von 35-40% 10 Wochen nach der Ablation aufwiesen. Gezeigt ist eine repräsentative ¹²³I-Szintigraphie-Aufnahme pro Gruppe.

4 Diskussion

4.1 MSC-vermittelte, Hypoxie-induzierte NIS-Expression für bildgebende Darstellungen und eine Radionuklidtherapie

Krebserkrankungen sind nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache in den Industrienationen und stellen die Medizin vor große Herausforderungen. Im Laufe des Lebens erkranken 51% der Männer und 43% der Frauen an Krebs und etwa jeder vierte Mann und jede fünfte Frau stirbt an ihrer Krebserkrankung (RKI, 2016). Eine große Herausforderung stellen hierbei Therapie-resistente bzw. metastasierende Tumoren dar (Sasportas *et al.*, 2009). Dies zeigt die Notwendigkeit der Entwicklung neuer, innovativer Therapiestrategien. Ein primäres Ziel ist es hierbei, die Tumoren und bereits ausgestreute Metastasen mit hoher Effizienz eliminieren zu können, aber gleichzeitig die Nebenwirkungen so gering wie möglich zu halten.

Ein vielversprechender Therapieansatz in diesem Zusammenhang ist die MSC-vermittelte Gentherapie, da MSCs nach systemischer Applikation in das wachsende Tumorstroma migrieren und damit, wie ein „Trojanisches Pferd“, als Transportvehikel für therapeutische Gene dienen können, die so gezielt und mit hoher Spezifität im Tumor und dessen Metastasen exprimiert werden (Hanahan & Weinberg, 2000, 2011; E. Spaeth *et al.*, 2008). Der Ansatz der MSC-vermittelten Gentherapie wurde bereits in verschiedenen präklinischen Studien getestet und führte zu signifikanten therapeutischen Effekten in einer Reihe von Tumormodellen (Dwyer *et al.*, 2010; Hanahan & Weinberg, 2011). So zeigten Studien von Niess *et al.*, Conrad *et al.* und Zischek *et al.*, wie bereits beschrieben, eine aktive Rekrutierung von MSCs, welche mit der HSV-TK unter der Kontrolle des RANTES Promoters transfiziert waren, in das Tumorstroma von Leber-, Brust- und Pankreastumoren, was nach Applikation von Ganciclovir zu einem signifikant geringerem Tumorwachstum, zu einem geringeren Auftreten von Metastasen und einem verlängerten Mausüberleben führte (Conrad *et al.*, 2007; Niess *et al.*, 2011; Zischek *et al.*, 2009). Aber auch in einer Reihe weiterer präklinischer Studien konnten durch die Verwendung von Immunmodulatoren (Interferon (IFN-) α , IFN- β , IL-2, IL-12, *chemokine (C-X3-C motif) ligand 1*), zytotoxischen Agenzien und Antagonisten (*Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand*, NK4, *Osteoprotegerin*, *Pigment epithelium-derived factor*) sowie anderer *gene-directed enzyme-producing therapies* (Cytosinaminase/5-Fluorocytosin, Carboxylesterase/CPT-11) in einer Reihe von Tumormodellen signifikante therapeutische Effekte erzielt werden (zusammengefasst von Hagenhoff *et al.* 2016 (Hagenhoff *et al.*, 2016)).

Für die Translation der MSC-vermittelten Gentherapie in eine klinische Studie sind allerdings theranostische Ansätze von großem Interesse, denn diese ermöglichen eine prätherapeutische

Analyse der Therapiegenexpression und damit eine individualisierte Therapieoptimierung. Ein vielversprechendes theranostisches Gen ist *NIS*, welches schon seit über 70 Jahren die Grundlage für die diagnostische Schilddrüsenszintigraphie und die Behandlung von Schilddrüsenkarzinomen und ausgestreuten Metastasen mit Radioiod bildet (Spitzweg & Morris, 2002). Durch die Verwendung von MSCs als Gentransfervehikel zum Transport von *NIS*, kann eine Applikation von Radioiod zur Bildgebung und Behandlung von Tumoren auch außerhalb der Schilddrüse ermöglicht werden. Die Verwendung von *NIS* als Reportergen ermöglicht eine nicht-invasive Darstellung der MSC-Biodistribution und *NIS*-Expression durch nuklearmedizinische Standardmethoden, wie die ^{123}I -/ $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Szintigraphie, ^{123}I -SPECT oder ^{124}I -/ ^{18}F -TFB-PET, und die Verwendung von *NIS* als Therapiegen ermöglicht die Induktion eines therapeutischen Effekts durch eine *NIS*-vermittelte ^{131}I - oder ^{188}Re -Therapie (Baril *et al.*, 2010; Spitzweg & Morris, 2001; Youn *et al.*, 2010). Ein großer Vorteil der *NIS*-vermittelten ^{131}I - oder ^{188}Re -Therapie ist deren hoher *Bystander*-Effekt, welcher auf dem *Crossfire*-Effekt der β -Strahlen dieser Radionuklide beruht (Spitzweg & Morris, 2001).

In einer ersten Studie der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. C. Spitzweg untersuchten Knoop *et al.* das generelle Potenzial der Verwendung von MSCs als Gentransfervehikel zum Transport von *NIS*, unter Kontrolle eines konstitutiv aktiven CMV Promoters, in das Tumorstroma eines subkutanen HuH7 Xenograftmausmodells (Knoop *et al.*, 2011). Durch die Verwendung von *NIS* als Reportergen konnte eine aktive Rekrutierung der MSCs in das wachsende Tumorstroma und eine damit verbundene *NIS*-vermittelte Radioiodakkumulation, durch ^{123}I -Szintigraphie- und ^{124}I -PET-Aufnahmen, gezeigt werden. Die Verwendung von *NIS* als Therapiegen führte zu einem signifikanten therapeutischen Effekt nach der Applikation von ^{131}I . Somit konnte in dieser Studie demonstriert werden, dass MSCs hervorragende Gentransfervehikel zum Transport von *NIS* in das Tumorstroma darstellen und, dass die *NIS*-Expression im Tumor sowohl für bildgebende als auch für therapeutische Anwendungen von Radioiod genutzt werden kann.

In einer weiteren Studie der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. C. Spitzweg versuchten Knoop *et al.* diesen Ansatz zu optimieren, indem sie für die Kontrolle der *NIS*-Expression keinen konstitutiv aktiven Promoter verwendeten, sondern einen Promoter, welcher im Tumorstroma im Rahmen der MSC-Rekrutierung und MSC-Differenzierung aktiviert wird. Dies hat den Vorteil, dass MSCs, welche aufgrund der Gewebshomöostase auch zu normalen Geweben migrieren (Von Luttichau *et al.*, 2005), dort aufgrund einer fehlenden Promoteraktivierung kein *NIS* exprimieren, was vor unerwünschten Nebeneffekten schützt. Als Tumor-spezifischer Promoter wurde in diesem Fall der RANTES Promoter gewählt, da die RANTES-Expression in MSCs induziert wird, sobald diese in das Tumorstroma migrieren (Karnoub *et al.*, 2007). Die systemische Injektion der RANTES-*NIS*-MSCs führte nach Applikation von ^{131}I zu einem signifikant langsameren Tumorwachstum und längerem Mausüberleben in einem subkutanen (Knoop *et al.*, 2013) und in einem orthotopen HuH7

Xenograftmausmodell (Knoop, 2014) sowie in einem Kolonkarzinom-Lebermetastasenmausmodell (Knoop *et al.*, 2015).

Eine große Herausforderung in der Krebstherapie stellen hypoxische Tumorzellen dar, da diese eine höhere Resistenz gegenüber vieler Chemo- und Radiotherapien aufweisen und ein hoher Grad an Hypoxie im Tumor mit einem aggressiveren Phänotyp assoziiert wird (Hockel & Vaupel, 2001; Y. Kim *et al.*, 2009). Um diese wichtigen Areale im Tumor gezielt erreichen zu können, wurde in der aktuellen Studie die Verwendung eines HRP zur selektiven Expression von NIS in den hypoxischen Tumorealen eines subkutanen und orthotopen HuH7 Xenograftmausmodells evaluiert.

Zu Beginn der Studie wurden MSCs generiert, welche NIS unter Kontrolle eines HRP exprimieren. Diese wurden anschließend *in vitro* durch die Analyse der NIS-Expression im Western Blot und der NIS-vermittelten ^{125}I -Aufnahme in einem funktionalen ^{125}I -Uptake Assay charakterisiert. Durch diese *in vitro* Analysen konnte gezeigt werden, dass sowohl durch eine Behandlung der HIF-NIS-MSCs mit dem Hypoxie-simulierenden Reagenz CoCl_2 als auch durch die Einwanderung dieser in das hypoxische Zentrum von HuH7 Sphäroiden, eine verstärkte NIS-Expression erzielt werden kann, welche in einem ^{125}I -Uptake Assay zu einer gesteigerten Radioiodaufnahme in die Zellen führte. Daraufhin wurden die MSC-Verteilung und die Hypoxie-induzierte NIS-Expression *in vivo* in einem subkutanen und orthotopen HuH7 Xenograftmausmodell getestet. Die systemische Injektion der HIF-NIS-MSCs in ein subkutanes HuH7 Xenograftmausmodell führte zu einer Perchlorat-abhängigen ^{123}I -Aufnahme von $\sim 3,9\%$ ID/g Tumor. Die erhöhte Radioiodaufnahme im Tumor, im Vergleich zu den Nichtzielorganen, konnte sowohl durch ein ^{124}I -/ ^{18}F -TFB-PET als auch durch eine *ex vivo* ^{123}I -Biodistributionsanalyse bestätigt werden. Die PET-Aufnahmen zeigten, dass die Radionuklidaufnahme im hypoxischen Tumorzentrum am höchsten und an den weniger hypoxischen Randbereichen am geringsten ist. Durch den neuen PET Tracer ^{18}F -TFB konnte zusätzlich die Bildqualität deutlich verbessert werden. Im Vergleich zu den HIF-NIS-MSCs führte die systemische Applikation der RANTES-NIS-MSCs in ein subkutanes HuH7 Xenograftmausmodell, in einer vorherigen Studie von Knoop *et al.*, zu einer deutlich höheren ^{123}I -Aufnahme von $\sim 6,5\%$ ID/g Tumor (Knoop *et al.*, 2013). Diese Beobachtung kann durch zwei Aspekte erklärt werden: (I) Beim RANTES Promoter handelt es sich um einen natürlichen und bei dem HRP um einen synthetischen Promoter. Native Promotoren zeigen eine höhere Effizienz als synthetische Promotoren. (II) Für die Induktion der NIS-Expression in den RANTES-NIS-MSCs müssen diese lediglich ins Tumorstroma migrieren und zur Induktion der NIS-Expression in den HIF-NIS-MSCs, nach der Tumorstromamigration, in die hypoxischen Areale des Tumors wandern. Im Vergleich zum subkutanen Modell führte die systemische Injektion der HIF-NIS-MSCs im orthotopen Modell zu einer wesentlich höheren Perchlorat-abhängigen ^{124}I -Aufnahme von $\sim 6,9\%$ ID/g Tumor, welche durch eine *ex vivo* ^{123}I -Biodistributionsanalyse bestätigt werden konnte. Somit konnte im

orthotopen Modell eine fast doppelt so hohe Radioiodaufnahme erzielt werden, wie im subkutanen Modell. Eine höhere ^{123}I -Aufnahme in orthotopen Tumoren, im Vergleich zu subkutanen Tumoren, konnte auch bei der Verwendung der RANTES-NIS-MSCs in vorherigen Studien von Knoop *et al.* beobachtet werden. Hier konnte im orthotopen Modell eine ^{123}I -Aufnahme von $\sim 16,5\%$ ID/g erreicht werden (Knoop, 2014), was eine fast dreifache Steigerung der Radioiodaufnahme im Tumor, im Vergleich zum subkutanen Modell, darstellt. Für die Differenz in der NIS-vermittelten Radioiodaufnahme zwischen dem subkutanen und dem orthotopen Modell konnte durch eine immunhistochemische Analyse der Dichte von HIF-NIS-MSCs im Tumor und der Hypoxie-induzierten NIS-Expression eine Erklärung gefunden werden: Im orthotopen Tumor wurden deutlich mehr MSCs detektiert, als im subkutanen Tumor. Dies war mit einer erhöhten NIS-Expression im orthotopen Tumor assoziiert. Die erhöhte NIS-Expression im orthotopen Tumor führte wiederum zu einer gesteigerten NIS-vermittelten Radioiodaufnahme, im Vergleich zum subkutanen Tumormodell. Eine höhere MSC-Rekrutierung in das orthotope HuH7 Modell, im Vergleich zum subkutanem HuH7 Modell, wurde auch in einer Studie von Garcia *et al.* beobachtet (Garcia *et al.*, 2011). Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass die Tumorzellen die Sekretion verschiedener Zytokine durch die Leberzellen induzieren, welche eine essenzielle Rolle bei der Rekrutierung der MSCs in das Tumorstroma spielen, wie z.B. der *tumour necrosis factor* (TNF)- α , IL-1 und VEGF (Garcia *et al.*, 2011; Vidal-Vanaclocha, 2008; Yagi *et al.*, 2010). Des Weiteren konnte in den Blutgefäßen der Leber eine erhöhte Expression verschiedener Adhäsionsmoleküle nachgewiesen werden, wie z.B. das *vascular cell adhesion molecule-1*, welche zusätzlich die MSC-Rekrutierung und deren Integration in das Stroma orthotoper HuH7 Tumoren fördern (Garcia *et al.*, 2011). Nicht zuletzt kann die unterschiedliche Vaskularisierung der Tumormodelle die Integration der MSCs in das Tumorstroma wesentlich beeinflussen.

In verschiedenen Studien wurde ein erhöhter Hypoxiegehalt im subkutanen Modell, im Vergleich zum orthotopen Modell, detektiert (Bagi *et al.*, 2011; Burgi *et al.*, 2014; Fukumura, Yuan, Monsky, Chen & Jain, 1997). Der Unterschied im Hypoxiegehalt kommt durch die unterschiedliche Vaskularisierung und die damit verbundene Sauerstoffversorgung der Tumoren zustande. Die subkutanen Tumoren werden nur durch die, vom Tumor gebildeten, Blutgefäße versorgt, wohingegen die orthotopen Tumoren zusätzlich durch die bereits bestehenden Blutgefäße des Organs, in dem sich diese befinden, versorgt werden (Bagi *et al.*, 2011; Burgi *et al.*, 2014; Fukumura *et al.*, 1997). Da in dieser Studie eine erhöhte NIS-vermittelte Radioiodaufnahme im orthotopen und nicht im subkutanen Modell beobachtet wurde, scheint hier die Anzahl der MSCs im Tumorstroma den größten Einfluss zu haben.

Neben den MSCs im Tumorstroma konnten zusätzlich noch MSCs in der Milz beobachtet werden, welche allerdings keine NIS-Expression zeigten. Das Vorhandensein von MSCs in der Milz ist

entweder auf eine direkte Rekrutierung (Von Luttichau *et al.*, 2005) oder auf einen Einschluss dieser in den feinen Blutgefäßen zurückzuführen (Furlani *et al.*, 2009; Gao, Dennis, Muzic, Lundberg & Caplan, 2001). Da diese allerdings keine NIS-Expression aufwiesen, konnte die Tumorspezifität dieses Ansatzes bestätigt werden.

Nachdem sowohl eine Rekrutierung der MSCs in das Tumorstroma der subkutanen und orthotopen HuH7 Tumoren als auch eine Hypoxie-induzierte, NIS-vermittelte Radioiodaufnahme beobachtet wurde, wurde in einer anschließenden Studie das Potenzial einer NIS-vermittelten Radioiodtherapie evaluiert. Im subkutanen Modell konnte nach der HIF-NIS-MSC-vermittelten ^{131}I -Aufnahme weder ein Unterschied in der Tumorumfangzunahme noch im Überleben der Mäuse zwischen der Therapiegruppe (HIF-NIS-MSC + ^{131}I) und den Kontrollgruppen (HIF-NIS-MSC + NaCl und WT-MSC + ^{131}I) beobachtet werden. Diese Ergebnisse wurden zusätzlich durch immunhistochemische Analysen der Tumorzellproliferation und Blutgefäßdichte im Tumor bestätigt. Im orthotopen Modell hingegen, führte die HIF-NIS-MSC-vermittelte ^{131}I -Aufnahme zu einer langsameren Tumorumfangzunahme und zu einem signifikant verlängerten Mausüberleben der Therapiegruppe (HIF-NIS-MSC + ^{131}I), im Vergleich zu den Kontrollgruppen (HIF-NIS-MSC + NaCl und WT-MSC + ^{131}I). Die geringere Tumorumfangzunahme konnte durch eine immunhistochemische Analyse der Tumorzellproliferation bestätigt werden. Die Therapiegruppe zeigte einen deutlich geringeren Gehalt an Ki67-positiven und somit proliferierenden Zellen im Tumor, verglichen mit den Kontrollgruppen. Neben der geringeren Tumorumfangzunahme wurde auch mittels CEUS eine geringere Tumorperfusion in der Therapiegruppe, im Vergleich zu den Kontrollgruppen, gemessen, was auf eine geringere Durchblutung schließen lässt. Die geringere Durchblutung der Therapietumoren stimmte mit der geringeren Anzahl an Blutgefäßen im Tumor, welche immunhistochemisch durch den CD31-Gehalt bestimmt wurden, überein. Die geringere Anzahl an Blutgefäßen und die geringe Durchblutung der Tumoren der Therapiegruppe lässt einen höheren Gehalt an Hypoxie vermuten, durch welchen die NIS-Expression in den HIF-NIS-MSCs gesteigert wird, was eine Selbstverstärkung des Therapieeffekts in dieser Therapiestrategie ermöglicht.

Die Unterschiede im Therapieansprechen zwischen dem subkutanen und orthotopen Modell beruhen somit auf der geringeren MSC-Rekrutierung in das Tumorstroma des subkutanen Tumors und der damit verbundenen geringeren NIS-Expression, welche zu einer geringeren Tumorabsorbierten ^{131}I -Dosis führte. Die Tumor-absorbierte ^{131}I -Dosis von 26,5 mGy/MBq/g Tumor für das subkutane Modell war zu gering, um einen therapeutischen Effekt in diesem Tumormodell zu erzielen. Für das orthotope Tumormodell wurde eine Tumor-absorbierte ^{131}I -Dosis von 46,8 mGy/MBq/g Tumor errechnet, welche fast doppelt so hoch, wie für das subkutane Tumormodell, und ausreichend für einen therapeutischen Effekt war. Durch die Verwendung der RANTES-NIS-

MSCs in einer vorherigen Studie von Knoop *et al.* konnte, aufgrund der höheren Tumor- absorbierten Dosis an ^{131}I , welche hier bei 44,3 mGy/MBq/g Tumor lag, auch im subkutanen Modell ein therapeutischer Effekt erzielt werden (Knoop *et al.*, 2013). Im orthotopen Modell konnte mit den RANTES-NIS-MSCs eine Tumor-absorbierte ^{131}I -Dosis von 96 mGy/MBq/g Tumor erreicht werden. Allerdings führte diese mehr als doppelt so hohe Tumor-absorbierte ^{131}I -Dosis, im Vergleich zu den HIF-NIS-MSCs im orthotopen Modell, zu keiner weiteren Steigerung des Mausüberlebens (Knoop, 2014), was vermuten lässt, dass eine Sättigung des Systems eingetreten ist und kein weiterer therapeutischer Effekt erzielt werden kann. Dies wurde auch schon in der Studie mit den RANTES-NIS-MSCs im subkutanen Modell vermutet, da trotz dreifach so hoher Tumor-absorbierter Dosis für das alternative therapeutische Radionuklid ^{188}Re , im Vergleich zu ^{131}I , kein verlängertes Mausüberleben sichtbar war (Knoop *et al.*, 2013).

Diese Ergebnisse zeigen, dass eine MSC-vermittelte, Hypoxie-induzierte, NIS-basierte ^{131}I -Therapie nur in dem klinisch relevanteren orthotopen Tumormodell zu therapeutischen Effekten führt. Das subkutane Modell wird häufig verwendet, um das generelle Konzept einer Therapiestrategie zu evaluieren, da subkutane Tumoren leicht zu etablieren sind und deren Wachstum einfacher zu beobachten ist (Bagi *et al.*, 2011). Das orthotope Modell hingegen ist mit einem weitaus größeren Aufwand verbunden, da die Mäuse hierfür operiert werden müssen und die Operation mit einer gewissen Mortalitätsrate assoziiert und die Überwachung des Tumorwachstums weitaus aufwendiger ist (Bagi *et al.*, 2011). Im subkutanen Modell können allerdings weder die Einflüsse einer bereits bestehenden Vaskularisierung noch die Interaktionen zwischen dem Tumor und dem Organ, in dem er wächst, abgeschätzt werden (Bagi *et al.*, 2011). Da das orthotope Modell die reale Situation im HCC-Patienten besser widerspiegelt, kann der Erfolg einer Therapiestrategie in diesem Modell weitaus besser abgeschätzt werden.

Um die MSC-vermittelte, Hypoxie-induzierte, NIS-basierte Radionuklidtherapie weiter zu optimieren, wäre die Verwendung eines dualen Promotersystems, z.B. durch eine Kombination des RANTES Promoters und des HRP, denkbar, denn so könnten normoxische und hypoxische Tumorzellen zugleich mit hoher Spezifität angegriffen werden, was einen höheren therapeutischen Effekt verspricht. Da es sich bei dem in dieser Studie verwendeten HRP um einen synthetischen Promoter handelt, würde auch die Verwendung eines natürlichen HRP vermutlich den therapeutischen Effekt steigern, denn neben der höheren Effektivität natürlicher Promotoren, ermöglichen diese zusätzlich die Integration weiterer Signale, welche z.B. durch Stress entstehen.

4.2 3-dimensionale Analyse der Tumervaskularisierung und der MSC-Rekrutierung in das Tumorstroma

MSCs stellen, wie bereits beschrieben, ideale Gentransfervehikel zum Transport von Reporter- und Therapiegenen in das wachsende Tumorstroma und bereits ausgestreute Metastasen dar (Conrad *et al.*, 2007; Knoop *et al.*, 2011; Knoop *et al.*, 2013; Knoop *et al.*, 2015; Niess *et al.*, 2011; Zischek *et al.*, 2009). In diesem Zusammenhang konnte in den vorherigen Studien gezeigt werden, dass die HIF-NIS-MSCs in das Tumorstroma eines subkutanen und orthotopen Leberkarzinommodells rekrutiert werden und dass diese, nach der Migration in die hypoxischen Areale des Tumors, NIS exprimieren. Eine wesentliche Voraussetzung für eine erfolgreiche NIS-vermittelte Radioiodtherapie ist, wie beim Vergleich des subkutanen und orthotopen Tumormodells gezeigt werden konnte, eine hohe MSC-Rekrutierung in das Tumorstroma. Diese kann von verschiedenen Faktoren beeinflusst werden, wie die Stärke der Inflammation und die Expression von verschiedenen Adhäsionsmolekülen (Garcia *et al.*, 2011; Vidal-Vanaclocha, 2008; Yagi *et al.*, 2010). Aber auch die Tumervaskularisierung scheint einen großen Einfluss auf diesen Prozess zu haben. In den vorherigen Studien wurde die MSC-Rekrutierung durch eine Antikörperfärbung mit einem *SV40 large T antigen*-spezifischen Antikörper auf Kryo- oder Paraffinschnitten der Tumoren analysiert. Allerdings können durch diese 2-dimensionalen Analysen weder die Tumervaskularisierung noch die Stammzellverteilung im Tumor, v.a. auch in Bezug auf die Distanz zu den Blutgefäßen, korrekt widerspiegelt werden. Aufgrund der Problematik 2-dimensionaler Analysen wurden bereits verschiedene Verfahren etabliert, durch welche Gewebe 3-dimensional betrachtet werden können. Eine Möglichkeit ist die physikalische Segmentierung des Gewebes in einzelne Schichten, die separate Betrachtung dieser einzelnen Schnitte und die nachträgliche Überlagerung dieser, um eine 3-dimensionale Darstellung zu erhalten (Richardson & Lichtman, 2015). Diese Methode ist allerdings mit verschiedenen technischen Herausforderungen verbunden, da es während des Schneidens des Gewebes zu Rissen, zu Unebenheiten aufgrund des Umklappens eines Gewebeendes, zu Kompressionen oder Streckungen kommen kann, wodurch die einzelnen Schnitte nicht mehr korrekt überlagert werden können (Richardson & Lichtman, 2015). Eine weitere Möglichkeit ist die „*blockface*“ Methode, bei welcher die Oberfläche eines Gewebes aufgenommen und nach dem Abtrennen dieser analysierten Oberfläche die neue Ebene dargestellt wird (Richardson & Lichtman, 2015). Ein Nachteil dieser Methode ist, dass die Oberfläche, nachdem sie aufgenommen und abgetrennt wurde, zerstört ist (Richardson & Lichtman, 2015). Eine weitere vielversprechende Methode ist die 3D-Lichtblattfluoreszenzmikroskopie. Diese ermöglicht eine 3-dimensionale Darstellung eines Gewebes, ohne dass dieses physikalisch in einzelne Segmente unterteilt werden muss (Richardson & Lichtman, 2015). Hierfür werden die Organe durch chemisches *Clearing* optisch sichtbar gemacht und anschließend durch die

Lichtblattfluoreszenzmikroskopie in optische Schnitte unterteilt (Feuchtinger *et al.*, 2016). Dies ermöglicht die Darstellung von Geweben im cm Bereich mit einer Auflösung im μm Bereich (Feuchtinger *et al.*, 2016). Da die Analyse der Stammzellrekrutierung und deren exakte Lokalisation innerhalb des Tumors für die MSC-basierte, NIS-vermittelte Radionuklidtherapie essenziell ist, wurde in einer initialen Studie das Potenzial der 3D-Lichtblattfluoreszenzmikroskopie für eine 3-dimensionale Darstellung dieser Aspekte untersucht.

Um zu Beginn einen generellen Überblick über das Wachstum des orthotopen Tumors in der Leber zu erhalten, wurde die Morphologie des orthotopen Tumors im Lebergewebe 3-dimensional betrachtet. Hierbei konnte gezeigt werden, dass dieser sich sowohl innerhalb des Lebergewebes ausbreitet als auch aus diesem hinaus wächst. Diese Beobachtung korrelierte mit der makroskopischen Analyse des orthotopen Tumors, ermöglichte jedoch zusätzlich eine präzisere Betrachtung der morphologischen Strukturen. So kann durch die Verwendung dieser Methode eine Veränderung der Beschaffenheit des orthotopen Tumors sowohl während des Wachstums als auch während der NIS-vermittelten Radionuklidtherapie beobachtet und dokumentiert werden.

Zudem wurde nach systemischer Applikation von CMV-NIS-MSCs, markiert mit dem CellTracker™ Deep Red, die Verteilung dieser innerhalb des orthotopen Tumors und nach einer intravenösen Injektion von Lektin, markiert mit dem VivoTag®-S 750 Fluorochrom, die Vaskularisierung des Tumors 3-dimensional gezeigt. Hierbei konnte beobachtet werden, dass der orthotope Tumor, im Vergleich zu der fein strukturierten Mikrovaskularisierung des gesunden Lebergewebes, sehr große prominente Blutgefäße aufzeigt. Die Blutgefäßdichte im orthotopen Tumor nimmt mit zunehmender Distanz zur Leber ab, sodass dieser einen kleinen Kern mit einer geringeren Blutgefäßdichte aufweist. Die MSCs sind als *Cluster* im kompletten Tumorstroma verteilt, wobei ein großer Teil in dem gering durchbluteten Kern des Tumors lokalisiert ist. Eine Lokalisierung von MSCs in *Clustern* im Tumorstroma wurde auch nach der Applikation der HIF-NIS-MSCs in den subkutanen und orthotopen HuH7 Tumoren beobachtet, ebenso wie in einer Studie von Belmar-Lopez *et al.*, in welcher die Rekrutierung der MSCs in subkutane HeLa Tumoren betrachtet wurde (Belmar-Lopez *et al.*, 2013). Die Migration von MSCs in gering durchblutete Bereiche ist mitunter auf ein erhöhtes HIF-1 Level zurückzuführen, denn dieses induziert die Expression verschiedener Hypoxie-responsiver Gene, welche wiederum die Expression verschiedener Chemokinrezeptoren auf den Tumorzellen erhöhen. So berichteten Sun *et al.* von einer erhöhten Expression des CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 3 (CXCR3) und des CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 5 (CXCR5) auf Brustkrebszellen (Sun, Wang & Zhao, 2014). Zu den Hypoxie-responsiven Genen gehören auch verschiedene inflammatorische Faktoren, wie z.B. das IL-6, welche in einer Studie von Rattigan *et al.* zu einer verstärkten Migration der MSCs zu verschiedenen Brustkrebszelllinien führten (Guan & Chen, 2013; Rattigan, Hsu, Mishra, Glod & Banerjee, 2010). Im gesunden Lebergewebe ist ein starkes Signal des

markierten Lektins zu beobachten. Dieses ist auf das dichte und feine Gefäßnetzwerk im Lebergewebe zurückzuführen. Ein CellTracker™ Deep Red Signal von den MSCs ist in dem gesunden Lebergewebe nicht zu beobachten, da die MSCs, wie auch schon bei der Verwendung der HIF-NIS-MSCs im orthotopen Tumormodell, nicht in das gesunde Lebergewebe rekrutiert werden. Durch diese 3-dimensionale Darstellung kann nicht nur der Anteil der MSCs im Tumor ermittelt, sondern auch die Distanz dieser zu den Blutgefäßen errechnet werden. Dies spielt vor allem bei der Verwendung des HRP eine Rolle, da in den HIF-NIS-MSCs die NIS-Expression mit zunehmender Distanz zu den Blutgefäßen steigt und diese eine essenzielle Rolle für den, in dieser Studie etablierten, Therapieansatz zur Behandlung von Lebertumoren spielt. So kann durch die 3-dimensionale Darstellung der prozentuale Anteil an NIS-exprimierenden MSCs errechnet und dadurch auch deren Migrationsverhalten zu hypoxischen Tumorregionen erforscht werden. Diese Analysen ermöglichen auch eine Evaluierung der Veränderung der Vaskularisierung während der NIS-vermittelten Radioiodtherapie, welche in unseren Studien stets zu einer geringeren Blutgefäßdichte geführt hat (Knoop *et al.*, 2011; Knoop *et al.*, 2013; Knoop *et al.*, 2015). Die 3D-Lichtblattfluoreszenzmikroskopie würde es in diesem Zusammenhang ermöglichen, die Veränderung der Blutgefäßdichte zu quantifizieren, aber auch Veränderungen in der Struktur der Blutgefäße zu erfassen (Feuchtinger *et al.*, 2016).

Um zu überprüfen, ob die Ergebnisse der 3D-Lichtblattfluoreszenzmikroskopie mit einer 2-dimensionalen Analyse der NIS-Expression nach einer Immunfluoreszenzfärbung korreliert werden können, wurde der orthotope Lebertumor nach der 3D-Lichtblattfluoreszenzmikroskopie segmentiert und die NIS-Expression auf diesen Tumorschnitten nach einer Antikörperfärbung durch Fluoreszenzmikroskopie ermittelt. Um die MSC-Verteilung im Tumor direkt mit der NIS-Expression korrelieren zu können, erhielten die Mäuse in diesem Versuch die CMV-NIS-MSCs, denn bei diesen exprimiert jede MSC, unabhängig von der Position im Tumorstroma, NIS. Die NIS-Expression auf den Tumorschnitten wurde anschließend mit den CellTracker™ Deep Red Signalen aus der jeweiligen Ebene der 3-dimensionalen Darstellung überlagert und zeigte eine Übereinstimmung. Somit konnte in diesen ersten Etablierungsversuchen gezeigt werden, dass diese „neue“ Methode nicht nur mit früheren Analysen korreliert, sondern zusätzlich eine detaillierte 3-dimensionale Darstellung der Vaskularisierung und MSC-Rekrutierung erlaubt.

Um die Möglichkeit zu haben, die Expression verschiedener Zytokine, Wachstumsfaktoren etc. im Tumor 3-dimensional zu analysieren, können in nachfolgenden Studien MSCs verwendet werden, welche mit einem Vektor transfiziert sind, welcher ein Fluoreszenzprotein codiert. Wenn die Expression dieses Fluoreszenzproteins unter Kontrolle eines Promoters steht, welcher durch die Expression des zu analysierenden Faktors aktiviert wird, wie z.B. der HRP, kann zusätzlich noch die

Expression des Tumor-spezifischen Faktors analysiert werden, wie in diesem Fall die HIF-1 α -Expression.

4.3 Effekte von Schilddrüsenhormonen auf das Hypoxie-responsive Netzwerk in MSCs

Die Schilddrüsenhormone T3 und T4 spielen nicht nur eine wesentliche Rolle beim Wachstum, der Entwicklung, der Zelldifferenzierung und vielen Stoffwechselwegen (Köhrle *et al.*, 2014), sondern haben auch einen wesentlichen Einfluss auf die Bildung des Tumorstromas (P. J. Davis *et al.*, 2009; P. J. Davis *et al.*, 2011). So können sie über genomische und nicht-genomische Effekte die Proliferation, Inflammation und Angiogenese im Tumorstroma modulieren. Einige dieser Aspekte sind das Resultat einer Schilddrüsenhormon-induzierten HIF-1 α -Expression und einer damit verbundenen erhöhten Expression einer Vielzahl von Hypoxie-responsiven Genen. Da eine durch Schilddrüsenhormone-induzierte verstärkte HIF-1 α -Expression einen bedeutenden Einfluss auf die in dieser Arbeit etablierte MSC-vermittelte, Hypoxie-induzierte, NIS-basierte Radioiodtherapie hat, wurde in einem nachfolgenden Teil dieser Arbeit der Effekt der Schilddrüsenhormone T3 und T4 auf das Hypoxie-responsive Netzwerk in MSCs untersucht. Zu Beginn der Studie wurde der Effekt von T3 und T4 in Gegenwart von 20% cHuH7M, um das Tumormilieu zu simulieren, auf die HIF-1 α -Expression in MSCs auf mRNA-Ebene untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass sowohl eine Stimulation mit T3 als auch mit T4 die HIF-1 α -Expression steigert, was durch die Zugabe von Tetrac stark gesenkt werden kann. Die Tetrac-Abhängigkeit zeigt, dass diese Effekte nicht-genomisch, über das Integrin $\alpha\beta 3$ vermittelt werden. In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung konnten auch Lin *et al.* eine erhöhte T3- bzw. T4-induzierte HIF-1 α -Expression in Integrin $\alpha\beta 3$ -exprimierenden Glioblastomzellen und Moretto *et al.* und Moeller *et al.* eine T3-induzierte HIF-1 α -Expression durch nicht-genomische Effekte in Brustkrebszellen bzw. Fibroblasten aus Patienten beobachten (Lin *et al.*, 2009; Moeller, Dumitrescu & Refetoff, 2005; Moretto *et al.*, 2016). Aufgrund der gesteigerten HIF-1 α -Expression nach einer Stimulation der MSCs mit T3 und T4 wurde auch eine vermehrte Expression Hypoxie-responsiver Gene erwartet, was durch den Nachweis einer gesteigerten, Tetrac-abhängigen Expression von *GLUT1*, *MCT4*, *STC1* und *PFKP* bestätigt wurde. Diese Gene spielen eine wichtige Rolle im Glukose- sowie im Calcium- und Phosphatmetabolismus (Moeller, Dumitrescu & Refetoff, 2005; Moeller, Dumitrescu, Walker, Meltzer & Refetoff, 2005; Moeller *et al.*, 2011). Somit können T3 und T4 das Hypoxie-responsive Netzwerk und den Stoffwechsel von MSCs durch nicht-genomische, Integrin $\alpha\beta 3$ -vermittelte Effekte wesentlich beeinflussen. Eine verstärkte Expression dieser Gene wurde auch in einer Studie von Moeller *et al.*, nach einer Stimulation humaner Fibroblasten mit T3, beobachtet (Moeller, Dumitrescu & Refetoff, 2005; Moeller, Dumitrescu, Walker, *et al.*, 2005; Moeller *et al.*, 2011). Da es sich hierbei um Hypoxie-responsive Gene handelt, ist der Effekt der Schilddrüsenhormone auf deren Expression vermutlich

nicht direkt, sondern indirekt und über die HIF-1 α -Expression vermittelt (Moeller, Dumitrescu, Walker, *et al.*, 2005). Diese Vermutung wird durch die Beobachtung von Moeller *et al.* untermauert, welche besagt, dass für die Expression von GLUT-1, MCT 4 und PFKP zuvor ein Transkriptionsfaktor wie HIF-1 exprimiert werden muss (Moeller, Dumitrescu & Refetoff, 2005). Somit resultiert die Tetrac-Abhängigkeit in diesem Fall aus der verminderten HIF-1 α -Expression nach der Zugabe von Tetrac, wodurch die Expression der Hypoxie-induzierbaren Gene zu einem geringeren Teil aktiviert wird. Um den Einfluss des Schilddrüsenhormonstatus eines Patienten auf die HIF-1 α -Expression in MSCs, und somit auf den in dieser Arbeit entwickelten Therapieansatz zur Behandlung von Leberkarzinomen, abschätzen zu können, wurde nachfolgend der T3 und T4 Effekt auf die HIF-1-induzierte, NIS-vermittelte Radioiodaufnahme in einem ^{125}I -Uptake Assay bestimmt. Durch diesen Versuch konnte gezeigt werden, dass sowohl durch eine Stimulation der HIF-NIS-MSCs mit T3 als auch mit T4 eine verstärkte HIF-1 α -Expression erzielt werden kann, welche wiederum zu einer erhöhten NIS-Expression und schließlich zu einer gesteigerten ^{125}I -Aufnahme in die Zelle führte. Die Tetrac-Abhängigkeit des T3- bzw. T4-induzierten Effekts zeigt, dass die verstärkte HIF-1 α -Expression durch das Integrin $\alpha\beta 3$ vermittelt wird und die Perchlorat-Abhängigkeit demonstriert, dass die ^{125}I -Aufnahme NIS vermittelt ist. In Gegenwart von 100% cHuH7M konnten stärkere T3- bzw. T4-induzierte Effekte auf die HIF-1 α -Expression beobachtet werden, als in Gegenwart von 20% cHuH7M. Diese Beobachtung ist vermutlich auf den Crosstalk des Integrin $\alpha\beta 3$ mit verschiedenen Wachstumsfaktorrezeptoren, wie z.B. der EGF-Rezeptor, FGF-Rezeptor, PDGF-Rezeptor, VEGF-Rezeptor, zurückzuführen (P. J. Davis *et al.*, 2011; E. Spaeth *et al.*, 2008). Die verstärkte Aktivierung dieser Wachstumsfaktorrezeptoren ist das Resultat einer erhöhten Konzentration ihrer Liganden, welche sich entweder im cHuH7M befinden oder in Anwesenheit des cHuH7M vermehrt von den MSCs exprimiert werden. In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung konnten Lin *et al.* eine verstärkte Aktivierung des MAPK Signalwegs, durch welchen auch die HIF-1 α -Expression induziert werden kann, nach einer Stimulation von HeLa Zellen mit T4 und EGF, beobachten (Lin, Shih, Davis & Davis, 1999). Um die Integrin $\alpha\beta 3$ -Abhängigkeit weiter zu untermauern, wurden die HIF-NIS-HuH7 generiert. Hierbei handelt es sich um eine Integrin $\alpha\beta 3$ -negative Zelllinie (Schmohl, Mueller, Wechselberger, *et al.*, 2015), welche mit einem Vektor transfiziert wurde, bei welchem NIS unter Kontrolle eines HRP's exprimiert wird. Die Induzierbarkeit des HRP's durch Hypoxie wurde nach einer Stimulation der Zellen mit CoCl_2 überprüft und führte zu einer gesteigerten Perchlorat-abhängigen Radioiodaufnahme im ^{125}I -Uptake Assay. Daraufhin wurden die HIF-NIS-HuH7 mit T3 oder T4 stimuliert und die Effekte auf die NIS-vermittelte ^{125}I -Aufnahme ermittelt. In dieser Integrin $\alpha\beta 3$ -negativen Zelllinie konnten keine Schilddrüsenhormoneffekte auf die ^{125}I -Aufnahme beobachtet werden, was erneut bestätigt, dass die Schilddrüsenhormoneffekte in den MSCs Integrin $\alpha\beta 3$ -vermittelt sind. Für die T3- bzw. T4-vermittelte Induktion der HIF-1 α -Expression durch das Integrin

$\alpha\text{v}\beta 3$ wurden bisher zwei verschiedene Signalwege beschrieben: T3 induziert die HIF-1 α -Expression über den PI3K Signalweg und T4 leitet die HIF-1 α -Expression über den ERK1/2 Signalweg ein (Moeller & Broecker-Preuss, 2011). Um zu überprüfen, ob die T3- bzw. T4-induzierten Effekte auf die HIF-1 α -Expression auch in MSCs über diese Signalwege vermittelt werden, wurden die HIF-NIS-MSCs zusätzlich mit einem Inhibitor des PI3K Signalwegs (LY294002) und mit einem Inhibitor des ERK1/2 Signalwegs (RAF265) stimuliert. Die T3-vermittelte, NIS-basierte ^{125}I -Aufnahme konnte durch LY294002 und RAF265 und die T4-induzierte, NIS-basierte ^{125}I -Aufnahme konnte durch RAF265 stark gesenkt werden. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass T3 die HIF-1 α -Expression sowohl durch den PI3K als auch durch den ERK1/2 Signalweg und T4 die HIF-1 α -Expression nur durch den ERK1/2 Signalweg induziert.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Schilddrüsenhormone T3 und T4 die HIF-1 α -Expression in MSCs *in vitro* steigern können, ist das Ziel einer nachfolgenden Studie die Analyse dieser Effekte *in vivo* in einem Tiermodell. Durch diese Untersuchungen würde nicht nur das generelle Verständnis der Wirkungsweisen von Schilddrüsenhormonen im Tumorstroma verbessert werden, sondern auch eine Abschätzung des Einflusses des Schilddrüsenhormonstatus eines Patienten auf diesen neu entwickelten Ansatz zur Therapie extrathyreoidaler Tumoren und ausgestreuten Metastasen ermöglichen. Ausgehend von den Ergebnissen, die innerhalb der *in vitro* Untersuchungen generiert wurden, würde in einem hyperthyreoten Patienten eine verstärkte Hypoxie-induzierte NIS-Expression erzielt werden, welche zu einer verstärkten ^{131}I -Aufnahme führen würde, wodurch der Therapieeffekt potenziert werden würde. Doch nicht nur durch die verstärkte HIF-1 α -Expression würde diese Therapiestrategie verstärkt werden, sondern wie in einer Studie von Schmohl *et al.* gezeigt werden konnte, führt eine Hyperthyreose, im Vergleich zur Euthyreose und v.a. Hypothyreose, in einem HuH7 Xenograftmausmodell, zu einer verstärkten Migration und Invasion von systemisch applizierten MSCs in das Tumorstroma (Schmohl, Mueller, Wechselberger, *et al.*, 2015). Die erhöhte Migration und Invasion der MSCs durch Schilddrüsenhormone würde die MSC-vermittelte, Hypoxie-induzierte, NIS-basierte Radioiodtherapie noch weiter unterstützen, denn wie in der vorliegenden Arbeit, beim Vergleich des subkutanen und orthotopen HuH7 Xenograftmausmodells, gezeigt wird, ist eine hohe Rekrutierung der MSCs in das Tumorstroma eine Voraussetzung für eine erfolgreiche MSC-vermittelte, NIS-basierte Radioiodtherapie. Da allerdings eine Hyperthyreose auch eine verstärkte HIF-1 α -Expression in den Tumorzellen induzieren kann, abhängig von der Schilddrüsenhormonrezeptorexpression der Tumorzellen, durch genomische oder nicht-genomische Effekte, und diese zu einer erhöhten Malignität des Tumors führt, bedarf es in diesem Fall einer Reihe von *in vivo* Untersuchungen, um all diese Effekte genauer zu analysieren. So kann ein besseres Verständnis über diese komplexen Zusammenhänge erlangt werden.

4.4 Entwicklung eines Protokolls zur Radioiodablation der Mausschilddrüse

Die Schilddrüsenhormone T3 und T4 spielen, wie bereits beschrieben, eine essenzielle Rolle in einer Vielzahl von physiologischen und pathophysiologischen Prozessen (Köhrle *et al.*, 2014). In diesem Zusammenhang können sie, wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, auch die HIF-1 α -Expression in Integrin $\alpha\beta 3$ -exprimierenden MSCs beeinflussen. Da die HIF-1 α -Expression die Grundlage für den, in dieser Arbeit entwickelten, Therapieansatz zur Behandlung extrathyreoidaler Tumoren und ausgestreuter Metastasen bildet, stellt die Analyse des Effekts der Schilddrüsenhormone auf das Hypoxie-responsive Netzwerk in MSCs einen weiteren wichtigen Aspekt dar. Um den Schilddrüsenhormonstatus im Tiermodell gezielt einstellen zu können und die NIS-vermittelte, und mit dem Schilddrüsenhormonstatus variierende, Radionuklidakkumulation in der Schilddrüse zu eliminieren, ist die Etablierung eines athyreoten Tiermodells von großer Bedeutung. Für die Generierung eines athyreoten Tiermodells kann die Schilddrüse durch eine Thyreoidektomie operativ entfernt oder durch die β -Strahlen von ^{131}I , welches über NIS in die Schilddrüsenfollikelzellen transportiert wird, ablatiert werden (Marks & Mitchell, 1971). Da die ^{131}I -vermittelte Schilddrüsenablation die weit weniger aufwendige Methode ist, war das Ziel der nachfolgenden Studie die Entwicklung eines Protokolls zur Radioiodablation der Mausschilddrüse. Dieses Projekt wurde in Zusammenarbeit mit Kathrin Schmohl (Medizinische Klinik und Poliklinik II, Klinikum der Universität München, München, Deutschland) durchgeführt. Zu Beginn wurde ein Protokoll von Gorbman modifiziert (Gorbman, 1947). Für diese Ablationsstrategie erhielten die Mäuse eine Woche vor der ^{131}I -Applikation eine LID, da dadurch nicht nur das, der Schilddrüse zur Verfügung stehende, Iod gesenkt wird, sondern auch die NIS-Expression in der Schilddrüse gesteigert und somit auch die Aufnahme des Radioiods in die Schilddrüse erhöht werden kann. Anschließend wurde den Mäusen, für eine gezielte Zerstörung des Schilddrüsengewebes, 18,5 MBq ^{131}I appliziert. Da die Tiere bei dieser Ablationsstrategie schon nach 1-2 Wochen Atemprobleme und einen starken Gewichtsverlust zeigten, mussten sie schon bald euthanasiert werden. Die Atemprobleme sind vermutlich das Resultat aus der Kombination der LID und der hohen ^{131}I -Dosis, da durch das iodarme Futter das ^{131}I zusätzlich in der Schilddrüse konzentriert wird. Aufgrund der geringen Größe der Mausschilddrüse und der dafür hohen Reichweite der β -Strahlen des ^{131}I von 2,4 mm (Dingli *et al.*, 2003), können zusätzlich auch die Zellen der die Schilddrüse umgebenden Gewebe zerstört werden (Gorbman, 1950). Um die ^{131}I -Dosis senken und trotzdem eine, für eine Schilddrüsenablation ausreichende, Dosis applizieren zu können, wurden in einem nächsten Versuch Protokolle von Abel *et al.* (Abel *et al.*, 1999) und Barca-Mayo *et al.* (Barca-Mayo *et al.*, 2011) getestet, bei welchen eine stärkere Stimulation der Radioiodaufnahme in die Schilddrüse und eine geringere ^{131}I -Dosis empfohlen wird. Diese Schilddrüsenablationsstrategie beruht auf einer Kombination bestehend aus einer LID, einer Applikation von bovinem TSH und einer Injektion von

5,5 MBq ^{131}I . Das bovine TSH kann neben der LID die NIS-Expression zusätzlich steigern und so die ^{131}I -Aufnahme in die Schilddrüsenfollikelzellen fördern. Der Erfolg der Schilddrüsenablation wurde anhand verschiedener Parameter bewertet. Zu Beginn wurde anhand der T4-Konzentration im Mausblut/Mausserum und der TSH β -Expression in der Hypophyse überprüft, ob noch Schilddrüsenhormone synthetisiert werden. Anschließend wurde das Vorhandensein von funktionsfähigem Schilddrüsenengewebe mit Hilfe einer bildgebenden Darstellung der NIS-Expression, durch eine $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Pertechetat-Szintigraphie, ermittelt. 10 Wochen nach der Ablation lag die T4-Konzentration im Blut/Serum der Mäuse unterhalb des Detektionslimits, die TSH β -Expression war um das ~44,7-fache gesteigert, bezogen auf die unbehandelten Kontrolltiere, und auch die $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Pertechetat-Aufnahme konnte, trotz maximaler NIS-Expression in den Schilddrüsenfollikelzellen, in den Schilddrüse-ablatierten Tieren komplett eliminiert werden. Die $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Pertechetat-Aufnahme, welche in der Halsregion zu beobachten ist, ist auf die Radionuklidaufnahme von den Speicheldrüsen zurückzuführen, welche sich in direkter Nachbarschaft der Schilddrüse befinden und NIS exprimieren (Antonica *et al.*, 2012; Spitzweg, Joba, Schriever, *et al.*, 1999). Aufgrund ihrer Größe überlappen die Signale der Speicheldrüsen und der Schilddrüse in dieser 2-dimensionalen Darstellung (Boschi *et al.*, 2013). Da die Speicheldrüsen das Radioiod nicht organifizieren können, und damit die absorbierte ^{131}I -Dosis geringer ist, werden diese weit weniger geschädigt, als die Schilddrüse, weshalb sie noch ihre Radionuklidaufnahme-fähigkeit besitzen und deshalb durch die $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Pertechetat-Szintigraphie dargestellt werden können. Diese Beobachtung wurde von Choi *et al.* bestätigt, welche durch eine 3-dimensionale SPECT Analyse nach der Schilddrüsenablation die Radionuklidaufnahme von der Schilddrüse und den Speicheldrüsen klar unterscheiden und nur noch eine $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Pertechetat-Aufnahme in die Speicheldrüsen beobachten konnten (Choi, Park, Kim, Lim & Kim, 2013).

Zusammenfassend konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass eine Schilddrüsenablation in Mäusen durch eine LID Vorbehandlung, eine TSH-Applikation und die Gabe von 5,5 MBq ^{131}I effektiv und gut verträglich ist. Dieses athyreote Tiermodell kann nun für die Untersuchung der Effekte von Schilddrüsenhormonen und Schilddrüsenhormonmetaboliten auf verschiedene Stoffwechselwege, unter Verwendung von NIS als Reportergen, verwendet werden, wodurch ein detaillierterer Einblick in eine Vielzahl physiologischer und pathophysiologischer Prozesse gewonnen werden kann.

5 Publikationen und Präsentationen

5.1 Veröffentlichte Manuskripte

Müller AM, Schmohl KA, Knoop K, Schug C, Urnauer S, Hagenhoff A, Clevert DA, Ingrisich M, Niess H, Carlsen J, Zach C, Wagner E, Bartenstein P, Nelson PJ, Spitzweg C.

Hypoxia-targeted ¹³¹I therapy of hepatocellular cancer after systemic mesenchymal stem cell-mediated sodium iodide symporter gene delivery. *Oncotarget*. 2016 Jul 21. doi: 10.18632/oncotarget.10758.

Urnauer S, Morys S, Levacic AK, **Müller AM**, Schug C, Schmohl KA, Schwenk N, Zach C, Carlsen J, Bartenstein P, Wagner E, Spitzweg C.

Sequence-defined cMET/HGFR-targeted polymers as gene delivery vehicles for the theranostic sodium iodide symporter (*NIS*) gene. *Mol Ther*. 2016 May 9. doi: 10.1038/mt.2016.95.

Schmohl KA, **Müller AM**, Wechselberger A, Rühland S, Salb N, Schwenk N, Heuer H, Carlsen J, Göke B, Nelson PJ, Spitzweg C.

Thyroid hormones and tetrac: new regulators of tumour stroma formation via integrin $\alpha\text{v}\beta 3$. *Endocr Relat Cancer*. 2015 Dec; 22(6):941-52. Doi: 10.1530/ERC-15-0245. Epub 2015 Aug 25.

Schmohl KA*, **Müller AM***, Schwenk N, Knoop K, Rijntjes E, Köhre J, Heuer H, Bartenstein P, Göke B, Nelson PJ, Spitzweg C.

Establishment of an effective radioiodide thyroid ablation protocol in mice. *Eur Thyroid J*. 2015 Sep;4(Suppl 1):74-80. doi: 10.1159/000381019. Epub 2015 May 23.

* geteilte Erstautorenschaft

Knoop K, Schwenk N, Schmohl K, **Müller A**, Zach C, Carlsen J, Böning G, Bartenstein P, Göke B, Wagner E, Nelson PJ, Spitzweg C.

Mesenchymal stem cell-mediated, tumor stroma-targeted radioiodine therapy of metastatic colon cancer using the sodium iodide symporter as theranostic gene. *J Nucl Med*. 2015 Apr;56(4):600-6. doi: 10.2967/jnumed.114.146662. Epub 2015 Mar5.

5.2 Manuskripte in Vorbereitung

Urnauer S, **Müller AM**, Schug C, Schmohl KA, Schwenk N, Rödl W, Ingrisich M, Mayr D, Gildehaus FJ, Bertram J, Bartenstein P, Clevert DA, Wagner E, Spitzweg C.

EGFR-targeted sodium-iodide-symporter gene therapy of metastatic colorectal cancer.

Schug C, Sievert W, Urnauer S, **Müller AM**, Schmohl KA, Wechselberger A, Schwenk N, Lauber K, Multhoff G, Nelson PJ, Spitzweg C.

Radiation of hepatocellular tumors enhances mesenchymal stem cell recruitment into the tumor microenvironment.

5.3 Vorträge

15th International Thyroid Congress, Orlando, Florida, USA, Oktober 2015.

Müller AM[#], Knoop K, Schmohl KA, Schwenk N, Hagenhoff A, Clevert DA, Zach C, Carlsen J, Gildehaus FJ, Niess H, Wagner E, Nelson PJ, Spitzweg C.

Using the hypoxia response network for tumour-targeted ¹³¹I therapy of orthotopic hepatocellular carcinoma xenografts after mesenchymal stem cell-mediated sodium iodide symporter gene delivery.

58. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie, Lübeck, Deutschland, März 2015.

Müller AM[#], Schmohl KA, Knoop K, Salb N, Schug C, Hofstetter M, Wechselberger A, Schwenk N, Nelson PJ, Spitzweg C.

Analysis of the effects of T3 and T4 on the hypoxia response network of mesenchymal stem cells.

30. Arbeitstagung Experimentelle Schilddrüsenforschung, Bremen, Deutschland, Dezember 2014.

Müller AM[#], Schmohl KA, Knoop K, Salb N, Schug C, Hofstetter M, Wechselberger A, Schwenk N, Nelson PJ, Spitzweg C.

Analysis of the effects of T3 and T4 on the hypoxia response network of mesenchymal stem cells.

38th Annual Meeting of the European Thyroid Association, Santiago de Compostela, Spanien, September 2014.

Knoop K, **Müller AM**[#], Schmohl KA, Schwenk N, Carlsen J, Hacker M, Göke B, Wagner E, Nelson PJ, Spitzweg C.

Image-guided, tumour stroma-targeted ¹³¹I therapy of hepatocellular carcinoma (HCC) using a HIF-1-specific sodium iodide symporter gene system.

Endocrine Society's 96th Annual Meeting and Expo, Chicago, Illinois, USA, Juni 2014.

Knoop K, **Müller AM**[#], Schmohl KA, Schwenk N, Carlsen J, Hacker M, Göke B, Wagner E, Nelson PJ, Spitzweg C.

In vivo imaging of mesenchymal stem cell recruitment into the tumor stroma of hepatocellular carcinoma (HCC) using a HIF-specific sodium iodide symporter (*NIS*) gene system.

57. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie, Dresden, Deutschland, März 2014.

Knoop K, **Müller AM**[#], Schmohl KA, Schwenk N, Carlsen J, Hacker M, Göke B, Wagner E, Nelson PJ, Spitzweg C.

In vivo imaging of mesenchymal stem cell recruitment into the tumor stroma of hepatocellular carcinoma (HCC) using a HIF-specific sodium iodide symporter gene system.

29. Arbeitstagung Experimentelle Schilddrüsenforschung, Essen, Deutschland, Dezember 2013.

Müller AM[#], Schmohl KA, Knoop K, Schwenk N, Wechselberger A, Nelson PJ, Spitzweg C.

Effects of thyroid hormones T3 and T4 on mesenchymal stem cell differentiation.

[#] Referent

5.4 Posterpräsentationen

83th Annual Meeting of the American Thyroid Association, San Juan, Puerto Rico, Oktober 2013.

Müller AM, Schmohl KA, Knoop K, Schwenk N, Wechselberger A, Nelson PJ, Spitzweg C.

Effects of thyroid hormones T3 and T4 on mesenchymal stem cell differentiation.

Endocrine Society's 97th Annual Meeting and Expo, San Diego, Kalifornien, USA, März 2015.

Müller AM, Schmohl KA, Knoop K, Salb N, Schug C, Wechselberger A, Schwenk N, Nelson PJ, Spitzweg C.

Analysis of the effects of T3 and T4 on the hypoxia response network of mesenchymal stem cells.

5.5 Reisekostenstipendien

Reisekostenstipendium von der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie, der European Thyroid Association und Teilnahme an dem 15th International Thyroid Congress Trainee Grant Program.

15th International Thyroid Congress, Orlando, Florida, USA, Oktober 2015.

Müller AM, Knoop K, Schmohl KA, Schwenk N, Hagenhoff A, Clevert DA, Zach C, Carlsen J, Gildehaus FJ, Niess H, Wagner E, Nelson PJ, Spitzweg C.

Using the hypoxia response network for tumour-targeted ¹³¹I therapy of orthotopic hepatocellular carcinoma xenografts after mesenchymal stem cell-mediated sodium iodide symporter gene delivery.

Reisekostenstipendium von der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie.

58. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie, Lübeck, Deutschland, März 2015.

Müller AM, Schmohl KA, Knoop K, Salb N, Schug C, Hofstetter M, Wechselberger A, Schwenk N, Nelson PJ, Spitzweg C.

Analysis of the effects of T3 and T4 on the hypoxia response network of mesenchymal stem cells.

Reisekostenstipendium von der European Thyroid Association.

38th Annual Meeting of the European Thyroid Association, Santiago de Compostela, Spanien, September 2014.

Knoop K, **Müller AM**, Schmohl KA, Schwenk N, Carlsen J, Hacker M, Göke B, Wagner E, Nelson PJ, Spitzweg C.

Image-guided, tumour stroma-targeted ¹³¹I therapy of hepatocellular carcinoma (HCC) using a HIF-1-specific sodium iodide symporter gene system.

Reisekostenstipendium von der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie.

57. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie, Dresden, Deutschland, März 2014.

Knoop K, **Müller AM**, Schmohl KA, Schwenk N, Carlsen J, Hacker M, Göke B, Wagner E, Nelson PJ, Spitzweg C.

In vivo imaging of mesenchymal stem cell recruitment into the tumor stroma of hepatocellular carcinoma (HCC) using a HIF-specific sodium iodide symporter gene system.

6 Literaturverzeichnis

- Abel, E. D., Boers, M. E., Pazos-Moura, C., Moura, E., Kaulbach, H., Zakaria, M., Lowell, B., Radovick, S., Liberman, M. C., & Wondisford, F. (1999). Divergent roles for thyroid hormone receptor beta isoforms in the endocrine axis and auditory system. *J Clin Invest*, 104(3), 291-300. doi:10.1172/jci6397
- Antonica, F., Kasprzyk, D. F., Opitz, R., Iacovino, M., Liao, X. H., Dumitrescu, A. M., Refetoff, S., Peremans, K., Manto, M., Kyba, M., & Costagliola, S. (2012). Generation of functional thyroid from embryonic stem cells. *Nature*, 491(7422), 66-71. doi:10.1038/nature11525
- Armulik, A., Genove, G., & Betsholtz, C. (2011). Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises. *Dev Cell*, 21(2), 193-215. doi:10.1016/j.devcel.2011.07.001
- ASGCT. (2016). Gene Therapy and Cell Therapy Defined. Retrieved from <http://www.asgct.org/general-public/educational-resources/gene-therapy--and-cell-therapy-defined>
- Bagi, C. M., Swanson, T., & Tuthill, T. (2011). Use of Ultrasound to Assess Drug Efficacy in Orthotopic Rat Models of HCC. In I. V. Minin & O. V. Minin (Eds.), *Ultrasound Imaging - Medical Applications* (pp. 283-295). Rijeka: InTech.
- Balkwill, F. R., Capasso, M., & Hagemann, T. (2012). The tumor microenvironment at a glance. *J Cell Sci*, 125(Pt 23), 5591-5596. doi:10.1242/jcs.116392
- Bandyopadhyay, U., Biswas, K., & Banerjee, R. K. (2002). Extrathyroidal actions of antithyroid thionamides. *Toxicol Lett*, 128(1-3), 117-127.
- Barca-Mayo, O., Liao, X. H., DiCosmo, C., Dumitrescu, A., Moreno-Vinasco, L., Wade, M. S., Sammani, S., Mirzapourzadeh, T., Garcia, J. G., Refetoff, S., & Weiss, R. E. (2011). Role of type 2 deiodinase in response to acute lung injury (ALI) in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(49), E1321-1329. doi:10.1073/pnas.1109926108
- Baril, P., Martin-Duque, P., & Vassaux, G. (2010). Visualization of gene expression in the live subject using the Na/I symporter as a reporter gene: applications in biotherapy. *Br J Pharmacol*, 159(4), 761-771. doi:10.1111/j.1476-5381.2009.00412.x
- Barry, F. P., & Murphy, J. M. (2004). Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol*, 36(4), 568-584. doi:10.1016/j.biocel.2003.11.001
- Belmar-Lopez, C., Mendoza, G., Oberg, D., Burnet, J., Simon, C., Cervello, I., Iglesias, M., Ramirez, J. C., Lopez-Larrubia, P., Quintanilla, M., & Martin-Duque, P. (2013). Tissue-derived mesenchymal

- stromal cells used as vehicles for anti-tumor therapy exert different in vivo effects on migration capacity and tumor growth. *BMC Med*, 11, 139. doi:10.1186/1741-7015-11-139
- Bergh, J. J., Lin, H. Y., Lansing, L., Mohamed, S. N., Davis, F. B., Mousa, S., & Davis, P. J. (2005). Integrin α V β 3 contains a cell surface receptor site for thyroid hormone that is linked to activation of mitogen-activated protein kinase and induction of angiogenesis. *Endocrinology*, 146(7), 2864-2871. doi:10.1210/en.2005-0102
- Bieback, K., Kern, S., Kocaomer, A., Ferlik, K., & Bugert, P. (2008). Comparing mesenchymal stromal cells from different human tissues: bone marrow, adipose tissue and umbilical cord blood. *Biomed Mater Eng*, 18(1 Suppl), S71-76.
- Boschi, F., Pagliazzi, M., Rossi, B., Cecchini, M. P., Gorgoni, G., Salgarello, M., & Spinelli, A. E. (2013). Small-animal radionuclide luminescence imaging of thyroid and salivary glands with Tc99m-pertechnetate. *J Biomed Opt*, 18(7), 76005. doi:10.1117/1.jbo.18.7.076005
- Brizel, D. M., Scully, S. P., Harrelson, J. M., Layfield, L. J., Bean, J. M., Prosnitz, L. R., & Dewhirst, M. W. (1996). Tumor oxygenation predicts for the likelihood of distant metastases in human soft tissue sarcoma. *Cancer Res*, 56(5), 941-943.
- Brizel, D. M., Sibley, G. S., Prosnitz, L. R., Scher, R. L., & Dewhirst, M. W. (1997). Tumor hypoxia adversely affects the prognosis of carcinoma of the head and neck. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 38(2), 285-289.
- Bruix, J., Hessheimer, A. J., Forner, A., Boix, L., Vilana, R., & Llovet, J. M. (2006). New aspects of diagnosis and therapy of hepatocellular carcinoma. *Oncogene*, 25(27), 3848-3856. doi:10.1038/sj.onc.1209548
- Burgi, S., Seuwen, A., Keist, R., Vom Berg, J., Grandjean, J., & Rudin, M. (2014). In vivo imaging of hypoxia-inducible factor regulation in a subcutaneous and orthotopic GL261 glioma tumor model using a reporter gene assay. *Mol Imaging*, 13, 1-11. doi:10.2310/7290.2014.00029
- Burrows, N., Babur, M., Resch, J., Williams, K. J., & Brabant, G. (2011). Hypoxia-inducible factor in thyroid carcinoma. *J Thyroid Res*, 2011, 762905. doi:10.4061/2011/762905
- Cai, W., & Chen, X. (2006). Anti-angiogenic cancer therapy based on integrin α v β 3 antagonism. *Anticancer Agents Med Chem*, 6(5), 407-428.
- Cano-Europa, E., Blas-Valdivia, V., Franco-Colin, M., Gallardo-Casas, C. A., & Ortiz-Butron, R. (2011). Methimazole-induced hypothyroidism causes cellular damage in the spleen, heart, liver, lung and kidney. *Acta Histochem*, 113(1), 1-5. doi:10.1016/j.acthis.2009.07.004
- Carrasco, N. (1993). Iodide transport in the thyroid gland. *Biochim Biophys Acta*, 1154(1), 65-82.

- Cengic, N., Baker, C. H., Schutz, M., Goke, B., Morris, J. C., & Spitzweg, C. (2005). A novel therapeutic strategy for medullary thyroid cancer based on radioiodine therapy following tissue-specific sodium iodide symporter gene expression. *J Clin Endocrinol Metab*, 90(8), 4457-4464. doi:10.1210/jc.2004-2140
- Chamberlain, G., Fox, J., Ashton, B., & Middleton, J. (2007). Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells*, 25(11), 2739-2749. doi:10.1634/stemcells.2007-0197
- Choi, J. S., Park, I. S., Kim, S. K., Lim, J. Y., & Kim, Y. M. (2013). Morphometric and functional changes of salivary gland dysfunction after radioactive iodine ablation in a murine model. *Thyroid*, 23(11), 1445-1451. doi:10.1089/thy.2012.0243
- Collet, G., Grillon, C., Nadim, M., & Kieda, C. (2013). Trojan horse at cellular level for tumor gene therapies. *Gene*, 525(2), 208-216. doi:10.1016/j.gene.2013.03.057
- Conrad, C., Gupta, R., Mohan, H., Niess, H., Bruns, C. J., Kopp, R., von Luetlichau, I., Guba, M., Heeschen, C., Jauch, K. W., Huss, R., & Nelson, P. J. (2007). Genetically engineered stem cells for therapeutic gene delivery. *Curr Gene Ther*, 7(4), 249-260.
- Conrad, C., Niess, H., Huss, R., Huber, S., von Luetlichau, I., Nelson, P. J., Ott, H. C., Jauch, K. W., & Bruns, C. J. (2009). Multipotent mesenchymal stem cells acquire a lymphendothelial phenotype and enhance lymphatic regeneration in vivo. *Circulation*, 119(2), 281-289. doi:10.1161/circulationaha.108.793208
- Cooke, V. G., LeBleu, V. S., Keskin, D., Khan, Z., O'Connell, J. T., Teng, Y., Duncan, M. B., Xie, L., Maeda, G., Vong, S., Sugimoto, H., Rocha, R. M., Damascena, A., Brentani, R. R., & Kalluri, R. (2012). Pericyte depletion results in hypoxia-associated epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis mediated by met signaling pathway. *Cancer Cell*, 21(1), 66-81. doi:10.1016/j.ccr.2011.11.024
- D'Arezzo, S., Incerpi, S., Davis, F. B., Acconcia, F., Marino, M., Farias, R. N., & Davis, P. J. (2004). Rapid nongenomic effects of 3,5,3'-triiodo-L-thyronine on the intracellular pH of L-6 myoblasts are mediated by intracellular calcium mobilization and kinase pathways. *Endocrinology*, 145(12), 5694-5703. doi:10.1210/en.2004-0890
- Dai, G., Levy, O., & Carrasco, N. (1996). Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter. *Nature*, 379(6564), 458-460. doi:10.1038/379458a0
- Davis, F. B., Mousa, S. A., O'Connor, L., Mohamed, S., Lin, H. Y., Cao, H. J., & Davis, P. J. (2004). Proangiogenic action of thyroid hormone is fibroblast growth factor-dependent and is initiated at the cell surface. *Circ Res*, 94(11), 1500-1506. doi:10.1161/01.RES.0000130784.90237.4a

- Davis, F. B., Tang, H. Y., Shih, A., Keating, T., Lansing, L., Hercbergs, A., Fenstermaker, R. A., Mousa, A., Mousa, S. A., Davis, P. J., & Lin, H. Y. (2006). Acting via a cell surface receptor, thyroid hormone is a growth factor for glioma cells. *Cancer Res*, 66(14), 7270-7275. doi:10.1158/0008-5472.can-05-4365
- Davis, G. L., Dempster, J., Meler, J. D., Orr, D. W., Walberg, M. W., Brown, B., Berger, B. D., O'Connor, J. K., & Goldstein, R. M. (2008). Hepatocellular carcinoma: management of an increasingly common problem. *Proc (Bayl Univ Med Cent)*, 21(3), 266-280.
- Davis, P. J., Davis, F. B., Lin, H. Y., Mousa, S. A., Zhou, M., & Luidens, M. K. (2009). Translational implications of nongenomic actions of thyroid hormone initiated at its integrin receptor. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 297(6), E1238-1246. doi:10.1152/ajpendo.00480.2009
- Davis, P. J., Davis, F. B., Mousa, S. A., Luidens, M. K., & Lin, H. Y. (2011). Membrane receptor for thyroid hormone: physiologic and pharmacologic implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 51, 99-115. doi:10.1146/annurev-pharmtox-010510-100512
- Davis, P. J., Goglia, F., & Leonard, J. L. (2016). Nongenomic actions of thyroid hormone. *Nat Rev Endocrinol*, 12(2), 111-121. doi:10.1038/nrendo.2015.205
- Digirolamo, C. M., Stokes, D., Colter, D., Phinney, D. G., Class, R., & Prockop, D. J. (1999). Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. *Br J Haematol*, 107(2), 275-281.
- Dingli, D., Diaz, R. M., Bergert, E. R., O'Connor, M. K., Morris, J. C., & Russell, S. J. (2003). Genetically targeted radiotherapy for multiple myeloma. *Blood*, 102(2), 489-496. doi:10.1182/blood-2002-11-3390
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., & Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315-317. doi:10.1080/14653240600855905
- Dvorak, H. F. (1986). Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med*, 315(26), 1650-1659. doi:10.1056/nejm198612253152606
- Dwyer, R. M., & Kerin, M. J. (2010). Mesenchymal stem cells and cancer: tumor-specific delivery vehicles or therapeutic targets? *Hum Gene Ther*, 21(11), 1506-1512. doi:10.1089/hum.2010.135

- Dwyer, R. M., Khan, S., Barry, F. P., O'Brien, T., & Kerin, M. J. (2010). Advances in mesenchymal stem cell-mediated gene therapy for cancer. *Stem Cell Res Ther*, 1(3), 25. doi:10.1186/scrt25
- Dwyer, R. M., Potter-Beirne, S. M., Harrington, K. A., Lowery, A. J., Hennessy, E., Murphy, J. M., Barry, F. P., O'Brien, T., & Kerin, M. J. (2007). Monocyte chemotactic protein-1 secreted by primary breast tumors stimulates migration of mesenchymal stem cells. *Clin Cancer Res*, 13(17), 5020-5027. doi:10.1158/1078-0432.ccr-07-0731
- Dwyer, R. M., Schatz, S. M., Bergert, E. R., Myers, R. M., Harvey, M. E., Classic, K. L., Blanco, M. C., Frisk, C. S., Marler, R. J., Davis, B. J., O'Connor, M. K., Russell, S. J., & Morris, J. C. (2005). A preclinical large animal model of adenovirus-mediated expression of the sodium-iodide symporter for radioiodide imaging and therapy of locally recurrent prostate cancer. *Mol Ther*, 12(5), 835-841. doi:10.1016/j.ymthe.2005.05.013
- Erez, N., Truitt, M., Olson, P., Arron, S. T., & Hanahan, D. (2010). Cancer-Associated Fibroblasts Are Activated in Incipient Neoplasia to Orchestrate Tumor-Promoting Inflammation in an NF-kappaB-Dependent Manner. *Cancer Cell*, 17(2), 135-147. doi:10.1016/j.ccr.2009.12.041
- Erturk, A., Becker, K., Jahrling, N., Mauch, C. P., Hojer, C. D., Egen, J. G., Hellal, F., Bradke, F., Sheng, M., & Dodt, H. U. (2012). Three-dimensional imaging of solvent-cleared organs using 3DISCO. *Nat Protoc*, 7(11), 1983-1995. doi:10.1038/nprot.2012.119
- Felgner, P. L., Barenholz, Y., Behr, J. P., Cheng, S. H., Cullis, P., Huang, L., Jessee, J. A., Seymour, L., Szoka, F., Thierry, A. R., Wagner, E., & Wu, G. (1997). Nomenclature for synthetic gene delivery systems. *Hum Gene Ther*, 8(5), 511-512. doi:10.1089/hum.1997.8.5-511
- Feng, B., & Chen, L. (2009). Review of mesenchymal stem cells and tumors: executioner or coconspirator? *Cancer Biother Radiopharm*, 24(6), 717-721. doi:10.1089/cbr.2009.0652
- Feuchtinger, A., Walch, A., & Dobosz, M. (2016). Deep tissue imaging: a review from a preclinical cancer research perspective. *Histochem Cell Biol*. doi:10.1007/s00418-016-1495-7
- Fridman, W. H., Pages, F., Sautes-Fridman, C., & Galon, J. (2012). The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer*, 12(4), 298-306. doi:10.1038/nrc3245
- Fukumura, D., Yuan, F., Monsky, W. L., Chen, Y., & Jain, R. K. (1997). Effect of host microenvironment on the microcirculation of human colon adenocarcinoma. *Am J Pathol*, 151(3), 679-688.
- Furlani, D., Ugurlucan, M., Ong, L., Bieback, K., Pittermann, E., Westien, I., Wang, W., Yerebakan, C., Li, W., Gaebel, R., Li, R. K., Vollmar, B., Steinhoff, G., & Ma, N. (2009). Is the intravascular administration of mesenchymal stem cells safe? Mesenchymal stem cells and intravital microscopy. *Microvasc Res*, 77(3), 370-376. doi:10.1016/j.mvr.2009.02.001

- Gabriel, R., Schmidt, M., & von Kalle, C. (2012). Integration of retroviral vectors. *Curr Opin Immunol*, 24(5), 592-597. doi:10.1016/j.coi.2012.08.006
- Galanis, E., Atherton, P. J., Maurer, M. J., Knutson, K. L., Dowdy, S. C., Cliby, W. A., Haluska, P., Jr., Long, H. J., Oberg, A., Aderca, I., Block, M. S., Bakkum-Gamez, J., Federspiel, M. J., Russell, S. J., Kalli, K. R., Keeney, G., Peng, K. W., & Hartmann, L. C. (2015). Oncolytic measles virus expressing the sodium iodide symporter to treat drug-resistant ovarian cancer. *Cancer Res*, 75(1), 22-30. doi:10.1158/0008-5472.can-14-2533
- Gao, J., Dennis, J. E., Muzic, R. F., Lundberg, M., & Caplan, A. I. (2001). The dynamic in vivo distribution of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after infusion. *Cells Tissues Organs*, 169(1), 12-20. doi:47856
- Garcia, M. G., Bayo, J., Bolontrade, M. F., Sganga, L., Malvicini, M., Alaniz, L., Aquino, J. B., Fiore, E., Rizzo, M. M., Rodriguez, A., Lorenti, A., Andriani, O., Podhajcer, O., & Mazzolini, G. (2011). Hepatocellular carcinoma cells and their fibrotic microenvironment modulate bone marrow-derived mesenchymal stromal cell migration in vitro and in vivo. *Mol Pharm*, 8(5), 1538-1548. doi:10.1021/mp200137c
- Gong, M., Bi, Y., Jiang, W., Zhang, Y., Chen, L., Hou, N., Liu, Y., Wei, X., Chen, J., & Li, T. (2011). Immortalized mesenchymal stem cells: an alternative to primary mesenchymal stem cells in neuronal differentiation and neuroregeneration associated studies. *J Biomed Sci*, 18, 87. doi:10.1186/1423-0127-18-87
- Gorbman, A. (1947). Effects of radiotoxic dosages of I131 upon thyroid and contiguous tissues in mice. *Proc Soc Exp Biol Med*, 66(1), 212.
- Gorbman, A. (1950). Functional and structural changes consequent to high dosages of radioactive iodine. *J Clin Endocrinol Metab*, 10(10), 1177-1191. doi:10.1210/jcem-10-10-1177
- Gruenwald, G. K., Klutz, K., Willhauck, M. J., Schwenk, N., Senekowitsch-Schmidtke, R., Schwaiger, M., Zach, C., Goke, B., Holm, P. S., & Spitzweg, C. (2013). Sodium iodide symporter (NIS)-mediated radiovirotherapy of hepatocellular cancer using a conditionally replicating adenovirus. *Gene Ther*, 20(6), 625-633. doi:10.1038/gt.2012.79
- Gruenwald, G. K., Vetter, A., Klutz, K., Willhauck, M. J., Schwenk, N., Senekowitsch-Schmidtke, R., Schwaiger, M., Zach, C., Wagner, E., Goke, B., Holm, P. S., Ogris, M., & Spitzweg, C. (2013a). EGFR-Targeted Adenovirus Dendrimer Coating for Improved Systemic Delivery of the Theranostic NIS Gene. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2, e131. doi:10.1038/mtna.2013.58
- Gruenwald, G. K., Vetter, A., Klutz, K., Willhauck, M. J., Schwenk, N., Senekowitsch-Schmidtke, R., Schwaiger, M., Zach, C., Wagner, E., Goke, B., Holm, P. S., Ogris, M., & Spitzweg, C. (2013b).

- Systemic image-guided liver cancer radiovirotherapy using dendrimer-coated adenovirus encoding the sodium iodide symporter as theranostic gene. *J Nucl Med*, 54(8), 1450-1457. doi:10.2967/jnumed.112.115493
- Guan, J., & Chen, J. (2013). Mesenchymal stem cells in the tumor microenvironment. *Biomed Rep*, 1(4), 517-521. doi:10.3892/br.2013.103
- Hagenhoff, A., Bruns, C. J., Zhao, Y., von Lutichau, I., Niess, H., Spitzweg, C., & Nelson, P. J. (2016). Harnessing mesenchymal stem cell homing as an anticancer therapy. *Expert Opin Biol Ther*, 16(9), 1079-1092. doi:10.1080/14712598.2016.1196179
- Hall, B., Dembinski, J., Sasser, A. K., Studeny, M., Andreeff, M., & Marini, F. (2007). Mesenchymal stem cells in cancer: tumor-associated fibroblasts and cell-based delivery vehicles. *Int J Hematol*, 86(1), 8-16. doi:10.1532/ijh97.06230
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57-70.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
- Harada, H. (2011). Gene Therapy Strategy for Tumour Hypoxia. In Y. You (Ed.), *Targets in Gene Therapy* (pp. 185-201). Rijeka: InTech.
- Hata, N., Shinojima, N., Gumin, J., Yong, R., Marini, F., Andreeff, M., & Lang, F. F. (2010). Platelet-derived growth factor BB mediates the tropism of human mesenchymal stem cells for malignant gliomas. *Neurosurgery*, 66(1), 144-156; discussion 156-147. doi:10.1227/01.neu.0000363149.58885.2e
- Hewitson, K. S., McNeill, L. A., Riordan, M. V., Tian, Y. M., Bullock, A. N., Welford, R. W., Elkins, J. M., Oldham, N. J., Bhattacharya, S., Gleadle, J. M., Ratcliffe, P. J., Pugh, C. W., & Schofield, C. J. (2002). Hypoxia-inducible factor (HIF) asparagine hydroxylase is identical to factor inhibiting HIF (FIH) and is related to the cupin structural family. *J Biol Chem*, 277(29), 26351-26355. doi:10.1074/jbc.C200273200
- Hiroi, Y., Kim, H. H., Ying, H., Furuya, F., Huang, Z., Simoncini, T., Noma, K., Ueki, K., Nguyen, N. H., Scanlan, T. S., Moskowitz, M. A., Cheng, S. Y., & Liao, J. K. (2006). Rapid nongenomic actions of thyroid hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(38), 14104-14109. doi:10.1073/pnas.0601600103
- Hockel, M., Knoop, C., Schlenger, K., Vorndran, B., Baussmann, E., Mitze, M., Knapstein, P. G., & Vaupel, P. (1993). Intratumoral pO₂ predicts survival in advanced cancer of the uterine cervix. *Radiother Oncol*, 26(1), 45-50.

- Hockel, M., & Vaupel, P. (2001). Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *J Natl Cancer Inst*, 93(4), 266-276.
- Jauregui-Osoro, M., Sunassee, K., Weeks, A. J., Berry, D. J., Paul, R. L., Cleij, M., Banga, J. P., O'Doherty, M. J., Marsden, P. K., Clarke, S. E., Ballinger, J. R., Szanda, I., Cheng, S. Y., & Blower, P. J. (2010). Synthesis and biological evaluation of [(18)F]tetrafluoroborate: a PET imaging agent for thyroid disease and reporter gene imaging of the sodium/iodide symporter. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 37(11), 2108-2116. doi:10.1007/s00259-010-1523-0
- Jiang, B. H., Zheng, J. Z., Leung, S. W., Roe, R., & Semenza, G. L. (1997). Transactivation and inhibitory domains of hypoxia-inducible factor 1alpha. Modulation of transcriptional activity by oxygen tension. *J Biol Chem*, 272(31), 19253-19260.
- Kaelin, W. G. (2005). Proline hydroxylation and gene expression. *Annu Rev Biochem*, 74, 115-128. doi:10.1146/annurev.biochem.74.082803.133142
- Kaelin, W. G., Jr., & Ratcliffe, P. J. (2008). Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Mol Cell*, 30(4), 393-402. doi:10.1016/j.molcel.2008.04.009
- Kakinuma, H., Bergert, E. R., Spitzweg, C., Cheville, J. C., Lieber, M. M., & Morris, J. C. (2003). Probasin promoter (ARR(2)PB)-driven, prostate-specific expression of the human sodium iodide symporter (h-NIS) for targeted radioiodine therapy of prostate cancer. *Cancer Res*, 63(22), 7840-7844.
- Kalluri, R., & Zeisberg, M. (2006). Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer*, 6(5), 392-401. doi:10.1038/nrc1877
- Kalyanaraman, H., Schwappacher, R., Joshua, J., Zhuang, S., Scott, B. T., Klos, M., Casteel, D. E., Frangos, J. A., Dillmann, W., Boss, G. R., & Pilz, R. B. (2014). Nongenomic thyroid hormone signaling occurs through a plasma membrane-localized receptor. *Sci Signal*, 7(326), ra48. doi:10.1126/scisignal.2004911
- Karnoub, A. E., Dash, A. B., Vo, A. P., Sullivan, A., Brooks, M. W., Bell, G. W., Richardson, A. L., Polyak, K., Tubo, R., & Weinberg, R. A. (2007). Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature*, 449(7162), 557-563. doi:10.1038/nature06188
- Kasirer-Friede, A., Kahn, M. L., & Shattil, S. J. (2007). Platelet integrins and immunoreceptors. *Immunol Rev*, 218, 247-264. doi:10.1111/j.1600-065X.2007.00532.x
- Kewley, R. J., Whitelaw, M. L., & Chapman-Smith, A. (2004). The mammalian basic helix-loop-helix/PAS family of transcriptional regulators. *Int J Biochem Cell Biol*, 36(2), 189-204.

- Kidd, S., Caldwell, L., Dietrich, M., Samudio, I., Spaeth, E. L., Watson, K., Shi, Y., Abbruzzese, J., Konopleva, M., Andreeff, M., & Marini, F. C. (2010). Mesenchymal stromal cells alone or expressing interferon-beta suppress pancreatic tumors in vivo, an effect countered by anti-inflammatory treatment. *Cytotherapy*, 12(5), 615-625. doi:10.3109/14653241003631815
- Kidd, S., Spaeth, E., Dembinski, J. L., Dietrich, M., Watson, K., Klopp, A., Battula, V. L., Weil, M., Andreeff, M., & Marini, F. C. (2009). Direct evidence of mesenchymal stem cell tropism for tumor and wounding microenvironments using in vivo bioluminescent imaging. *Stem Cells*, 27(10), 2614-2623. doi:10.1002/stem.187
- Kim, H. A., Mahato, R. I., & Lee, M. (2009). Hypoxia-specific gene expression for ischemic disease gene therapy. *Adv Drug Deliv Rev*, 61(7-8), 614-622. doi:10.1016/j.addr.2009.04.009
- Kim, Y., Lin, Q., Glazer, P. M., & Yun, Z. (2009). Hypoxic tumor microenvironment and cancer cell differentiation. *Curr Mol Med*, 9(4), 425-434.
- Kizaka-Kondoh, S., Tanaka, S., Harada, H., & Hiraoka, M. (2009). The HIF-1-active microenvironment: an environmental target for cancer therapy. *Adv Drug Deliv Rev*, 61(7-8), 623-632. doi:10.1016/j.addr.2009.01.006
- Klopp, A. H., Gupta, A., Spaeth, E., Andreeff, M., & Marini, F., 3rd. (2011). Concise review: Dissecting a discrepancy in the literature: do mesenchymal stem cells support or suppress tumor growth? *Stem Cells*, 29(1), 11-19. doi:10.1002/stem.559
- Klutz, K., Russ, V., Willhauck, M. J., Wunderlich, N., Zach, C., Gildehaus, F. J., Goke, B., Wagner, E., Ogris, M., & Spitzweg, C. (2009). Targeted radioiodine therapy of neuroblastoma tumors following systemic nonviral delivery of the sodium iodide symporter gene. *Clin Cancer Res*, 15(19), 6079-6086. doi:10.1158/1078-0432.ccr-09-0851
- Klutz, K., Schaffert, D., Willhauck, M. J., Grunwald, G. K., Haase, R., Wunderlich, N., Zach, C., Gildehaus, F. J., Senekowitsch-Schmidtke, R., Goke, B., Wagner, E., Ogris, M., & Spitzweg, C. (2011). Epidermal growth factor receptor-targeted (131)I-therapy of liver cancer following systemic delivery of the sodium iodide symporter gene. *Mol Ther*, 19(4), 676-685. doi:10.1038/mt.2010.296
- Klutz, K., Willhauck, M. J., Dohmen, C., Wunderlich, N., Knoop, K., Zach, C., Senekowitsch-Schmidtke, R., Gildehaus, F. J., Ziegler, S., Furst, S., Goke, B., Wagner, E., Ogris, M., & Spitzweg, C. (2011). Image-guided tumor-selective radioiodine therapy of liver cancer after systemic nonviral delivery of the sodium iodide symporter gene. *Hum Gene Ther*, 22(12), 1563-1574. doi:10.1089/hum.2011.041

- Knoop, K. (2014). *Molecular imaging and radionuclide therapy in non-thyroidal tumors after mesenchymal stem cell- mediated sodium/iodide symporter (NIS) gene transfer*. (Dissertation). Retrieved from <http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:bvb:19-178550>
- Knoop, K., Kolokythas, M., Klutz, K., Willhauck, M. J., Wunderlich, N., Draganovici, D., Zach, C., Gildehaus, F. J., Boning, G., Goke, B., Wagner, E., Nelson, P. J., & Spitzweg, C. (2011). Image-guided, tumor stroma-targeted ¹³¹I therapy of hepatocellular cancer after systemic mesenchymal stem cell-mediated NIS gene delivery. *Mol Ther*, 19(9), 1704-1713. doi:10.1038/mt.2011.93
- Knoop, K., Schwenk, N., Dolp, P., Willhauck, M. J., Zischek, C., Zach, C., Hacker, M., Goke, B., Wagner, E., Nelson, P. J., & Spitzweg, C. (2013). Stromal targeting of sodium iodide symporter using mesenchymal stem cells allows enhanced imaging and therapy of hepatocellular carcinoma. *Hum Gene Ther*, 24(3), 306-316. doi:10.1089/hum.2012.104
- Knoop, K., Schwenk, N., Schmohl, K., Mueller, A., Zach, C., Cyran, C., Carlsen, J., Boning, G., Bartenstein, P., Goke, B., Wagner, E., Nelson, P. J., & Spitzweg, C. (2015). Mesenchymal stem cell-mediated, tumor stroma-targeted radioiodine therapy of metastatic colon cancer using the sodium iodide symporter as theranostic gene. *J Nucl Med*, 56(4), 600-606. doi:10.2967/jnumed.114.146662
- Kogai, T., & Brent, G. A. (2012). The sodium iodide symporter (NIS): regulation and approaches to targeting for cancer therapeutics. *Pharmacol Ther*, 135(3), 355-370. doi:10.1016/j.pharmthera.2012.06.007
- Köhrle, J., Schomburg, L., & Schweizer, U. (2014). Schilddrüsenhormone – Zentrale Regulatoren von Entwicklung, Wachstum, Grundumsatz, Stoffwechsel und Zelldifferenzierung. In C. P. Heinrich, M. Müller, & L. Graeve (Eds.), *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie* (pp. 512-527). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Komarova, S., Kawakami, Y., Stoff-Khalili, M. A., Curiel, D. T., & Pereboeva, L. (2006). Mesenchymal progenitor cells as cellular vehicles for delivery of oncolytic adenoviruses. *Mol Cancer Ther*, 5(3), 755-766. doi:10.1158/1535-7163.mct-05-0334
- Lando, D., Peet, D. J., Whelan, D. A., Gorman, J. J., & Whitelaw, M. L. (2002). Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch. *Science*, 295(5556), 858-861. doi:10.1126/science.1068592
- Lei, J., Bhargava, M., & Ingbar, D. H. (2009). Cell-specific signal transduction pathways regulating Na⁺-K⁺-ATPase. Focus on "short-term effects of thyroid hormones on the Na⁺-K⁺-ATPase

- activity of chick embryo hepatocytes during development: focus on signal transduction". *Am J Physiol Cell Physiol*, 296(1), C1-3. doi:10.1152/ajpcell.00553.2008
- Lei, J., Mariash, C. N., & Ingbar, D. H. (2004). 3,3',5-Triiodo-L-thyronine up-regulation of Na,K-ATPase activity and cell surface expression in alveolar epithelial cells is Src kinase- and phosphoinositide 3-kinase-dependent. *J Biol Chem*, 279(46), 47589-47600. doi:10.1074/jbc.M405497200
- Li, H., Fan, X., & Houghton, J. (2007). Tumor microenvironment: the role of the tumor stroma in cancer. *J Cell Biochem*, 101(4), 805-815. doi:10.1002/jcb.21159
- Lin, H. Y., Shih, A., Davis, F. B., & Davis, P. J. (1999). Thyroid hormone promotes the phosphorylation of STAT3 and potentiates the action of epidermal growth factor in cultured cells. *Biochem J*, 338 (Pt 2), 427-432.
- Lin, H. Y., Sun, M., Tang, H. Y., Lin, C., Luidens, M. K., Mousa, S. A., Incerpi, S., Drusano, G. L., Davis, F. B., & Davis, P. J. (2009). L-Thyroxine vs. 3,5,3'-triiodo-L-thyronine and cell proliferation: activation of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *Am J Physiol Cell Physiol*, 296(5), C980-991. doi:10.1152/ajpcell.00305.2008
- Lin, H. Y., Tang, H. Y., Shih, A., Keating, T., Cao, G., Davis, P. J., & Davis, F. B. (2007). Thyroid hormone is a MAPK-dependent growth factor for thyroid cancer cells and is anti-apoptotic. *Steroids*, 72(2), 180-187. doi:10.1016/j.steroids.2006.11.014
- Lin, H. Y., Zhang, S., West, B. L., Tang, H. Y., Passaretti, T., Davis, F. B., & Davis, P. J. (2003). Identification of the putative MAP kinase docking site in the thyroid hormone receptor-beta1 DNA-binding domain: functional consequences of mutations at the docking site. *Biochemistry*, 42(24), 7571-7579. doi:10.1021/bi0273967
- Liu, R., Li, Z., Bai, S., Zhang, H., Tang, M., Lei, Y., Chen, L., Liang, S., Zhao, Y. L., Wei, Y., & Huang, C. (2009). Mechanism of cancer cell adaptation to metabolic stress: proteomics identification of a novel thyroid hormone-mediated gastric carcinogenic signaling pathway. *Mol Cell Proteomics*, 8(1), 70-85. doi:10.1074/mcp.M800195-MCP200
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4), 402-408. doi:10.1006/meth.2001.1262
- Mali, S. (2013). Delivery systems for gene therapy. *Indian J Hum Genet*, 19(1), 3-8. doi:10.4103/0971-6866.112870

- Marks, S. C., & Mitchell, T. G. (1971). Thyroid ablation in young mice--a technique combining surgery and iodine-131. *Int J Appl Radiat Isot*, 22(4), 263-267.
- Masson, N., & Ratcliffe, P. J. (2003). HIF prolyl and asparaginyl hydroxylases in the biological response to intracellular O(2) levels. *J Cell Sci*, 116(Pt 15), 3041-3049. doi:10.1242/jcs.00655
- Masson, N., Willam, C., Maxwell, P. H., Pugh, C. W., & Ratcliffe, P. J. (2001). Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor-alpha chains activated by prolyl hydroxylation. *Embo j*, 20(18), 5197-5206. doi:10.1093/emboj/20.18.5197
- Mazzaferro, V., Chun, Y. S., Poon, R. T., Schwartz, M. E., Yao, F. Y., Marsh, J. W., Bhoori, S., & Lee, S. G. (2008). Liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *Ann Surg Oncol*, 15(4), 1001-1007. doi:10.1245/s10434-007-9559-5
- McNeill, L. A., Hewitson, K. S., Gleadle, J. M., Horsfall, L. E., Oldham, N. J., Maxwell, P. H., Pugh, C. W., Ratcliffe, P. J., & Schofield, C. J. (2002). The use of dioxygen by HIF prolyl hydroxylase (PHD1). *Bioorg Med Chem Lett*, 12(12), 1547-1550.
- Mendler, C. T., Feuchtinger, A., Heid, I., Aichler, M., D'Alessandria, C., Pirsig, S., Blechert, B., Wester, H. J., Braren, R., Walch, A., Skerra, A., & Schwaiger, M. (2016). Tumor uptake of anti-CD20 Fabs depends on tumor perfusion. *J Nucl Med*. doi:10.2967/jnumed.116.176784
- Moeller, L. C., & Broecker-Preuss, M. (2011). Transcriptional regulation by nonclassical action of thyroid hormone. *Thyroid Res*, 4 Suppl 1, S6. doi:10.1186/1756-6614-4-s1-s6
- Moeller, L. C., Cao, X., Dumitrescu, A. M., Seo, H., & Refetoff, S. (2006). Thyroid hormone mediated changes in gene expression can be initiated by cytosolic action of the thyroid hormone receptor beta through the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Nucl Recept Signal*, 4, e020. doi:10.1621/nrs.04020
- Moeller, L. C., Dumitrescu, A. M., & Refetoff, S. (2005). Cytosolic action of thyroid hormone leads to induction of hypoxia-inducible factor-1alpha and glycolytic genes. *Mol Endocrinol*, 19(12), 2955-2963. doi:10.1210/me.2004-0542
- Moeller, L. C., Dumitrescu, A. M., Walker, R. L., Meltzer, P. S., & Refetoff, S. (2005). Thyroid hormone responsive genes in cultured human fibroblasts. *J Clin Endocrinol Metab*, 90(2), 936-943. doi:10.1210/jc.2004-1768
- Moeller, L. C., Haselhorst, N. E., Dumitrescu, A. M., Cao, X., Seo, H., Refetoff, S., Mann, K., & Janssen, O. E. (2011). Stanniocalcin 1 induction by thyroid hormone depends on thyroid hormone receptor beta and phosphatidylinositol 3-kinase activation. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 119(2), 81-85. doi:10.1055/s-0030-1262860

- Mohr, A., Lyons, M., Deedigan, L., Harte, T., Shaw, G., Howard, L., Barry, F., O'Brien, T., & Zwacka, R. (2008). Mesenchymal stem cells expressing TRAIL lead to tumour growth inhibition in an experimental lung cancer model. *J Cell Mol Med*, 12(6b), 2628-2643. doi:10.1111/j.1582-4934.2008.00317.x
- Moretto, F. C., De Sibio, M. T., Luvizon, A. C., Olimpio, R. M., de Oliveira, M., Alves, C. A., Conde, S. J., & Nogueira, C. R. (2016). Triiodothyronine (T3) induces HIF1A and TGFA expression in MCF7 cells by activating PI3K. *Life Sci*, 154, 52-57. doi:10.1016/j.lfs.2016.04.024
- Nakamizo, A., Marini, F., Amano, T., Khan, A., Studeny, M., Gumin, J., Chen, J., Hentschel, S., Vecil, G., Dembinski, J., Andreeff, M., & Lang, F. F. (2005). Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas. *Cancer Res*, 65(8), 3307-3318. doi:10.1158/0008-5472.can-04-1874
- Nakamura, K., Ito, Y., Kawano, Y., Kurozumi, K., Kobune, M., Tsuda, H., Bizen, A., Honmou, O., Niitsu, Y., & Hamada, H. (2004). Antitumor effect of genetically engineered mesenchymal stem cells in a rat glioma model. *Gene Ther*, 11(14), 1155-1164. doi:10.1038/sj.gt.3302276
- NguyenThai, Q. A., Sharma, N., Luong do, H., Sodhi, S. S., Kim, J. H., Kim, N., Oh, S. J., & Jeong, D. K. (2015). Targeted inhibition of osteosarcoma tumor growth by bone marrow-derived mesenchymal stem cells expressing cytosine deaminase/5-fluorocytosine in tumor-bearing mice. *J Gene Med*, 17(3-5), 87-99. doi:10.1002/jgm.2826
- Nieman, K. M., Kenny, H. A., Penicka, C. V., Ladanyi, A., Buell-Gutbrod, R., Zillhardt, M. R., Romero, I. L., Carey, M. S., Mills, G. B., Hotamisligil, G. S., Yamada, S. D., Peter, M. E., Gwin, K., & Lengyel, E. (2011). Adipocytes promote ovarian cancer metastasis and provide energy for rapid tumor growth. *Nat Med*, 17(11), 1498-1503. doi:10.1038/nm.2492
- Niess, H., Bao, Q., Conrad, C., Zischek, C., Notohamiprodjo, M., Schwab, F., Schwarz, B., Huss, R., Jauch, K. W., Nelson, P. J., & Bruns, C. J. (2011). Selective targeting of genetically engineered mesenchymal stem cells to tumor stroma microenvironments using tissue-specific suicide gene expression suppresses growth of hepatocellular carcinoma. *Ann Surg*, 254(5), 767-774; discussion 774-765. doi:10.1097/SLA.0b013e3182368c4f
- Niess, H., von Einem, J. C., Thomas, M. N., Michl, M., Angele, M. K., Huss, R., Gunther, C., Nelson, P. J., Bruns, C. J., & Heinemann, V. (2015). Treatment of advanced gastrointestinal tumors with genetically modified autologous mesenchymal stromal cells (TREAT-ME1): study protocol of a phase I/II clinical trial. *BMC Cancer*, 15, 1-13. doi:10.1186/s12885-015-1241-x

- NIH. (2016). Gene Therapy and Radioactive Iodine in Treating Patients With Locally Recurrent Prostate Cancer That Did Not Respond to External-Beam Radiation Therapy. Retrieved from <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00788307>
- Nordsmark, M., Overgaard, M., & Overgaard, J. (1996). Pretreatment oxygenation predicts radiation response in advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *Radiother Oncol*, 41(1), 31-39.
- Orimo, A., Gupta, P. B., Sgroi, D. C., Arenzana-Seisdedos, F., Delaunay, T., Naeem, R., Carey, V. J., Richardson, A. L., & Weinberg, R. A. (2005). Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell*, 121(3), 335-348. doi:10.1016/j.cell.2005.02.034
- Ostman, A., & Augsten, M. (2009). Cancer-associated fibroblasts and tumor growth--bystanders turning into key players. *Curr Opin Genet Dev*, 19(1), 67-73. doi:10.1016/j.gde.2009.01.003
- Otto, T., & Fandrey, J. (2008). Thyroid hormone induces hypoxia-inducible factor 1alpha gene expression through thyroid hormone receptor beta/retinoid x receptor alpha-dependent activation of hepatic leukemia factor. *Endocrinology*, 149(5), 2241-2250. doi:10.1210/en.2007-1238
- Palmer, L. A., Semenza, G. L., Stoler, M. H., & Johns, R. A. (1998). Hypoxia induces type II NOS gene expression in pulmonary artery endothelial cells via HIF-1. *Am J Physiol*, 274(2 Pt 1), L212-219.
- Poret-Bazin, H., Simon, E. G., Bleuzen, A., Dujardin, P. A., Patat, F., & Perrotin, F. (2013). Decrease of uteroplacental blood flow after feticide during second-trimester pregnancy termination with complete placenta previa: quantitative analysis using contrast-enhanced ultrasound imaging. *Placenta*, 34(11), 1113-1115. doi:10.1016/j.placenta.2013.08.002
- Pouyssegur, J., & Mechta-Grigoriou, F. (2006). Redox regulation of the hypoxia-inducible factor. *Biol Chem*, 387(10-11), 1337-1346. doi:10.1515/bc.2006.167
- Pugh, C. W., O'Rourke, J. F., Nagao, M., Gleadle, J. M., & Ratcliffe, P. J. (1997). Activation of hypoxia-inducible factor-1; definition of regulatory domains within the alpha subunit. *J Biol Chem*, 272(17), 11205-11214.
- Raper, S. E., Chirmule, N., Lee, F. S., Wivel, N. A., Bagg, A., Gao, G. P., Wilson, J. M., & Batshaw, M. L. (2003). Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol Genet Metab*, 80(1-2), 148-158.

- Rattigan, Y., Hsu, J. M., Mishra, P. J., Glod, J., & Banerjee, D. (2010). Interleukin 6 mediated recruitment of mesenchymal stem cells to the hypoxic tumor milieu. *Exp Cell Res*, 316(20), 3417-3424. doi:10.1016/j.yexcr.2010.07.002
- Ren, C., Kumar, S., Chanda, D., Chen, J., Mountz, J. D., & Ponnazhagan, S. (2008). Therapeutic potential of mesenchymal stem cells producing interferon-alpha in a mouse melanoma lung metastasis model. *Stem Cells*, 26(9), 2332-2338. doi:10.1634/stemcells.2008-0084
- Rhim, T., Lee, D. Y., & Lee, M. (2013). Hypoxia as a target for tissue specific gene therapy. *J Control Release*, 172(2), 484-494. doi:10.1016/j.jconrel.2013.05.021
- Richardson, D. S., & Lichtman, J. W. (2015). Clarifying Tissue Clearing. *Cell*, 162(2), 246-257. doi:10.1016/j.cell.2015.06.067
- RKI. (2016). Zentrum für Krebsregistrierdaten. Retrieved from http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Krebs_gesamt/krebs_gesamt_node.html
- Ross, D. S., Downing, M. F., Chin, W. W., Kieffer, J. D., & Ridgway, E. C. (1983a). Changes in tissue concentrations of thyrotropin, free thyrotropin beta, and alpha-subunits after thyroxine administration: comparison of mouse hypothyroid pituitary and thyrotropic tumors. *Endocrinology*, 112(6), 2050-2053. doi:10.1210/endo-112-6-2050
- Ross, D. S., Downing, M. F., Chin, W. W., Kieffer, J. D., & Ridgway, E. C. (1983b). Divergent changes in murine pituitary concentration of free alpha- and thyrotropin beta-subunits in hypothyroidism and after thyroxine administration. *Endocrinology*, 112(1), 187-193. doi:10.1210/endo-112-1-187
- Ross, D. S., Downing, M. F., Chin, W. W., & Ridgway, E. C. (1984). Discordant changes in pituitary concentrations of LH and TSH subunits following hormonal manipulation. *Metabolism*, 33(3), 230-234.
- Rudinger, A., Mylotte, K. M., Davis, P. J., Davis, F. B., & Blas, S. D. (1984). Rabbit myocardial membrane Ca²⁺-adenosine triphosphatase activity: stimulation in vitro by thyroid hormone. *Arch Biochem Biophys*, 229(1), 379-385.
- Sasaki, M., Abe, R., Fujita, Y., Ando, S., Inokuma, D., & Shimizu, H. (2008). Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type. *J Immunol*, 180(4), 2581-2587.
- Sasportas, L. S., Kasmieh, R., Wakimoto, H., Hingtgen, S., van de Water, J. A., Mohapatra, G., Figueiredo, J. L., Martuza, R. L., Weissleder, R., & Shah, K. (2009). Assessment of therapeutic

- efficacy and fate of engineered human mesenchymal stem cells for cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(12), 4822-4827. doi:10.1073/pnas.0806647106
- Schaffert, D., & Wagner, E. (2008). Gene therapy progress and prospects: synthetic polymer-based systems. *Gene Ther*, 15(16), 1131-1138. doi:10.1038/gt.2008.105
- Schmohl, K. A., Mueller, A. M., Schwenk, N., Knoop, K., Rijntjes, E., Kohrle, J., Heuer, H., Bartenstein, P., Goke, B., Nelson, P. J., & Spitzweg, C. (2015). Establishment of an Effective Radioiodide Thyroid Ablation Protocol in Mice. *Eur Thyroid J*, 4(Suppl 1), 74-80. doi:10.1159/000381019
- Schmohl, K. A., Mueller, A. M., Wechselberger, A., Ruhland, S., Salb, N., Schwenk, N., Heuer, H., Carlsen, J., Goke, B., Nelson, P. J., & Spitzweg, C. (2015). Thyroid hormones and tetrac: new regulators of tumour stroma formation via integrin $\alpha v \beta 3$. *Endocr Relat Cancer*, 22(6), 941-952. doi:10.1530/erc-15-0245
- Schodel, J., Oikonomopoulos, S., Ragoussis, J., Pugh, C. W., Ratcliffe, P. J., & Mole, D. R. (2011). High-resolution genome-wide mapping of HIF-binding sites by ChIP-seq. *Blood*, 117(23), e207-217. doi:10.1182/blood-2010-10-314427
- Schofield, C. J., & Zhang, Z. (1999). Structural and mechanistic studies on 2-oxoglutarate-dependent oxygenases and related enzymes. *Curr Opin Struct Biol*, 9(6), 722-731.
- Scholz, I. V., Cengic, N., Baker, C. H., Harrington, K. J., Maletz, K., Bergert, E. R., Vile, R., Goke, B., Morris, J. C., & Spitzweg, C. (2005). Radioiodine therapy of colon cancer following tissue-specific sodium iodide symporter gene transfer. *Gene Ther*, 12(3), 272-280. doi:10.1038/sj.gt.3302410
- Scott, D. A., Wang, R., Kreman, T. M., Sheffield, V. C., & Karniski, L. P. (1999). The Pendred syndrome gene encodes a chloride-iodide transport protein. *Nat Genet*, 21(4), 440-443. doi:10.1038/7783
- Sedlacek, H.-H. (2013). *Onkologie - die Tumorerkrankungen des Menschen: Entstehung, Abwehr und Behandlungsmöglichkeiten*. Berlin: De Gruyter.
- Semenza, G. L. (2012). Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression and targets for cancer therapy. *Trends Pharmacol Sci*, 33(4), 207-214. doi:10.1016/j.tips.2012.01.005
- Shimoda, L. A. (2012). 55th Bowditch Lecture: Effects of chronic hypoxia on the pulmonary circulation: role of HIF-1. *J Appl Physiol* (1985), 113(9), 1343-1352. doi:10.1152/jappphysiol.00843.2012
- Shinagawa, K., Kitadai, Y., Tanaka, M., Sumida, T., Kodama, M., Higashi, Y., Tanaka, S., Yasui, W., & Chayama, K. (2010). Mesenchymal stem cells enhance growth and metastasis of colon cancer. *Int J Cancer*, 127(10), 2323-2333. doi:10.1002/ijc.25440

- Shupnik, M. A., Chin, W. W., Ross, D. S., Downing, M. F., Habener, J. F., & Ridgway, E. C. (1983). Regulation by thyroxine of the mRNA encoding the alpha subunit of mouse thyrotropin. *J Biol Chem*, 258(24), 15120-15124.
- Siegrist-Kaiser, C. A., Juge-Aubry, C., Tranter, M. P., Ekenbarger, D. M., & Leonard, J. L. (1990). Thyroxine-dependent modulation of actin polymerization in cultured astrocytes. A novel, extranuclear action of thyroid hormone. *J Biol Chem*, 265(9), 5296-5302.
- Sinanan, A. C., Machell, J. R., Wynne-Hughes, G. T., Hunt, N. P., & Lewis, M. P. (2008). Alpha v beta 3 and alpha v beta 5 integrins and their role in muscle precursor cell adhesion. *Biol Cell*, 100(8), 465-477. doi:10.1042/bc20070115
- Smanik, P. A., Liu, Q., Furminger, T. L., Ryu, K., Xing, S., Mazzaferri, E. L., & Jhiang, S. M. (1996). Cloning of the human sodium iodide symporter. *Biochem Biophys Res Commun*, 226(2), 339-345.
- Sohni, A., & Verfaillie, C. M. (2013). Mesenchymal stem cells migration homing and tracking. *Stem Cells Int*, 2013, 130763. doi:10.1155/2013/130763
- Spaeth, E., Klopp, A., Dembinski, J., Andreeff, M., & Marini, F. (2008). Inflammation and tumor microenvironments: defining the migratory itinerary of mesenchymal stem cells. *Gene Ther*, 15(10), 730-738. doi:10.1038/gt.2008.39
- Spaeth, E. L., Dembinski, J. L., Sasser, A. K., Watson, K., Klopp, A., Hall, B., Andreeff, M., & Marini, F. (2009). Mesenchymal stem cell transition to tumor-associated fibroblasts contributes to fibrovascular network expansion and tumor progression. *PLoS One*, 4(4), e4992. doi:10.1371/journal.pone.0004992
- Spitzweg, C. (2003). Der Natrium-Jodid-Symporter (NIS). *Der Internist*, 44(4), 396-411. doi:10.1007/s00108-003-0877-9
- Spitzweg, C., Dietz, A. B., O'Connor, M. K., Bergert, E. R., Tindall, D. J., Young, C. Y., & Morris, J. C. (2001). In vivo sodium iodide symporter gene therapy of prostate cancer. *Gene Ther*, 8(20), 1524-1531. doi:10.1038/sj.gt.3301558
- Spitzweg, C., Harrington, K. J., Pinke, L. A., Vile, R. G., & Morris, J. C. (2001). Clinical review 132: The sodium iodide symporter and its potential role in cancer therapy. *J Clin Endocrinol Metab*, 86(7), 3327-3335. doi:10.1210/jcem.86.7.7641
- Spitzweg, C., Joba, W., Morris, J. C., & Heufelder, A. E. (1999). Regulation of sodium iodide symporter gene expression in FRTL-5 rat thyroid cells. *Thyroid*, 9(8), 821-830. doi:10.1089/thy.1999.9.821

- Spitzweg, C., Joba, W., Schriever, K., Goellner, J. R., Morris, J. C., & Heufelder, A. E. (1999). Analysis of human sodium iodide symporter immunoreactivity in human exocrine glands. *J Clin Endocrinol Metab*, 84(11), 4178-4184. doi:10.1210/jcem.84.11.6117
- Spitzweg, C., & Morris, J. C. (2001). Approaches to gene therapy with sodium/iodide symporter. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 109(1), 56-59. doi:10.1055/s-2001-11020
- Spitzweg, C., & Morris, J. C. (2002). The sodium iodide symporter: its pathophysiological and therapeutic implications. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 57(5), 559-574.
- Spitzweg, C., & Morris, J. C. (2004). Gene therapy for thyroid cancer: current status and future prospects. *Thyroid*, 14(6), 424-434. doi:10.1089/105072504323150732
- Spitzweg, C., O'Connor, M. K., Bergert, E. R., Tindall, D. J., Young, C. Y., & Morris, J. C. (2000). Treatment of prostate cancer by radioiodine therapy after tissue-specific expression of the sodium iodide symporter. *Cancer Res*, 60(22), 6526-6530.
- Srinivas, V., Zhang, L. P., Zhu, X. H., & Caro, J. (1999). Characterization of an oxygen/redox-dependent degradation domain of hypoxia-inducible factor alpha (HIF-alpha) proteins. *Biochem Biophys Res Commun*, 260(2), 557-561. doi:10.1006/bbrc.1999.0878
- Sterling, K., Brenner, M. A., & Sakurada, T. (1980). Rapid effect of triiodothyronine on the mitochondrial pathway in rat liver in vivo. *Science*, 210(4467), 340-342.
- Stewart, B. W., & Wild, C. P. (2014). World cancer report 2014.
- Studeny, M., Marini, F. C., Dembinski, J. L., Zompetta, C., Cabreira-Hansen, M., Bekele, B. N., Champlin, R. E., & Andreeff, M. (2004). Mesenchymal stem cells: potential precursors for tumor stroma and targeted-delivery vehicles for anticancer agents. *J Natl Cancer Inst*, 96(21), 1593-1603. doi:10.1093/jnci/djh299
- Sun, Z., Wang, S., & Zhao, R. C. (2014). The roles of mesenchymal stem cells in tumor inflammatory microenvironment. *J Hematol Oncol*, 7, 14. doi:10.1186/1756-8722-7-14
- Sundfor, K., Lyng, H., & Rofstad, E. K. (1998). Tumour hypoxia and vascular density as predictors of metastasis in squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Br J Cancer*, 78(6), 822-827.
- Swartz, M. A., & Lund, A. W. (2012). Lymphatic and interstitial flow in the tumour microenvironment: linking mechanobiology with immunity. *Nat Rev Cancer*, 12(3), 210-219. doi:10.1038/nrc3186
- Szybalska, E. H., & Szybalski, W. (1962). GENETICS OF HUMAN CELL LINES, IV. DNA-MEDIATED HERITABLE TRANSFORMATION OF A BIOCHEMICAL TRAIT. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 48(12), 2026-2034.

- Tang, H. Y., Lin, H. Y., Zhang, S., Davis, F. B., & Davis, P. J. (2004). Thyroid hormone causes mitogen-activated protein kinase-dependent phosphorylation of the nuclear estrogen receptor. *Endocrinology*, 145(7), 3265-3272. doi:10.1210/en.2004-0308
- Thalmeier, K., Meissner, P., Reisbach, G., Falk, M., Brechtel, A., & Dormer, P. (1994). Establishment of two permanent human bone marrow stromal cell lines with long-term post irradiation feeder capacity. *Blood*, 83(7), 1799-1807.
- Thomlinson, R. H., & Gray, L. H. (1955). The histological structure of some human lung cancers and the possible implications for radiotherapy. *Br J Cancer*, 9(4), 539-549.
- Uchibori, R., Tsukahara, T., Ohmine, K., & Ozawa, K. (2014). Cancer gene therapy using mesenchymal stem cells. *Int J Hematol*, 99(4), 377-382. doi:10.1007/s12185-014-1537-7
- Urnauer, S., Morys, S., Krhac Levacic, A., Mueller, A. M., Schug, C., Schmohl, K. A., Schwenk, N., Zach, C., Carlsen, J., Bartenstein, P., Wagner, E., & Spitzweg, C. (2016). Sequence-defined cMET/HGFR-targeted Polymers as Gene Delivery Vehicles for the Theranostic Sodium Iodide Symporter (NIS) Gene. *Mol Ther*. doi:10.1038/mt.2016.95
- Usha, L., Rao, G., Christopherson li, K., & Xu, X. (2013). Mesenchymal stem cells develop tumor tropism but do not accelerate breast cancer tumorigenesis in a somatic mouse breast cancer model. *PLoS One*, 8(9), e67895. doi:10.1371/journal.pone.0067895
- Vaupel, P., & Harrison, L. (2004). Tumor hypoxia: causative factors, compensatory mechanisms, and cellular response. *Oncologist*, 9 Suppl 5, 4-9. doi:10.1634/theoncologist.9-90005-4
- Vidal-Vanaclocha, F. (2008). The prometastatic microenvironment of the liver. *Cancer Microenviron*, 1(1), 113-129. doi:10.1007/s12307-008-0011-6
- Von Luttichau, I., Notohamiprodjo, M., Wechselberger, A., Peters, C., Henger, A., Seliger, C., Djafarzadeh, R., Huss, R., & Nelson, P. J. (2005). Human adult CD34- progenitor cells functionally express the chemokine receptors CCR1, CCR4, CCR7, CXCR5, and CCR10 but not CXCR4. *Stem Cells Dev*, 14(3), 329-336. doi:10.1089/scd.2005.14.329
- Wang, G. L., Jiang, B. H., Rue, E. A., & Semenza, G. L. (1995). Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(12), 5510-5514.
- Wels, J., Kaplan, R. N., Rafii, S., & Lyden, D. (2008). Migratory neighbors and distant invaders: tumor-associated niche cells. *Genes Dev*, 22(5), 559-574. doi:10.1101/gad.1636908
- Willhauck, M. J., Sharif Samani, B. R., Klutz, K., Cengic, N., Wolf, I., Mohr, L., Geissler, M., Senekowitsch-Schmidtke, R., Goke, B., Morris, J. C., & Spitzweg, C. (2008). Alpha-fetoprotein

- promoter-targeted sodium iodide symporter gene therapy of hepatocellular carcinoma. *Gene Ther*, 15(3), 214-223. doi:10.1038/sj.gt.3303057
- Wolff, J. A., & Rozema, D. B. (2008). Breaking the bonds: non-viral vectors become chemically dynamic. *Mol Ther*, 16(1), 8-15. doi:10.1038/sj.mt.6300326
- Xia, X., Lemieux, M. E., Li, W., Carroll, J. S., Brown, M., Liu, X. S., & Kung, A. L. (2009). Integrative analysis of HIF binding and transactivation reveals its role in maintaining histone methylation homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(11), 4260-4265. doi:10.1073/pnas.0810067106
- Yagi, H., Soto-Gutierrez, A., Parekkadan, B., Kitagawa, Y., Tompkins, R. G., Kobayashi, N., & Yarmush, M. L. (2010). Mesenchymal stem cells: Mechanisms of immunomodulation and homing. *Cell Transplant*, 19(6), 667-679. doi:10.3727/096368910x508762
- Yang, Q., McHugh, K. P., Patntirapong, S., Gu, X., Wunderlich, L., & Hauschka, P. V. (2008). VEGF enhancement of osteoclast survival and bone resorption involves VEGF receptor-2 signaling and beta3-integrin. *Matrix Biol*, 27(7), 589-599. doi:10.1016/j.matbio.2008.06.005
- Youn, H., Jeong, J. M., & Chung, J. K. (2010). A new PET probe, (18)F-tetrafluoroborate, for the sodium/iodide symporter: possible impacts on nuclear medicine. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 37(11), 2105-2107. doi:10.1007/s00259-010-1601-3
- Yuan, Y., Hilliard, G., Ferguson, T., & Millhorn, D. E. (2003). Cobalt inhibits the interaction between hypoxia-inducible factor-alpha and von Hippel-Lindau protein by direct binding to hypoxia-inducible factor-alpha. *J Biol Chem*, 278(18), 15911-15916. doi:10.1074/jbc.M300463200
- Zielske, S. P., Livant, D. L., & Lawrence, T. S. (2009). Radiation increases invasion of gene-modified mesenchymal stem cells into tumors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 75(3), 843-853. doi:10.1016/j.ijrobp.2008.06.1953
- Zimna, A., & Kurpisz, M. (2015). Hypoxia-Inducible Factor-1 in Physiological and Pathophysiological Angiogenesis: Applications and Therapies. *Biomed Res Int*, 2015, 549412. doi:10.1155/2015/549412
- Zischek, C., Niess, H., Ischenko, I., Conrad, C., Huss, R., Jauch, K. W., Nelson, P. J., & Bruns, C. (2009). Targeting tumor stroma using engineered mesenchymal stem cells reduces the growth of pancreatic carcinoma. *Ann Surg*, 250(5), 747-753. doi:10.1097/SLA.0b013e3181bd62d0

7 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen Personen, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre, bedanken.

Zu Beginn möchte ich Prof. Dr. Peter Nelson für die Möglichkeit, dieses spannende Projekt im Rahmen meiner Doktorarbeit bearbeiten zu dürfen, für seine exzellente Betreuung und für die Bereitstellung des Equipments und der Infrastruktur, danken. Zusätzlich möchte ich ihm für die großartige Hilfe bei jeglicher Art von Fragen, für die zahlreichen wissenschaftlichen Diskussionen und persönlichen Gespräche, für die Möglichkeit, die Projekte auf nationalen und internationalen Kongressen präsentieren zu dürfen und neue wissenschaftliche Kontakte zu knüpfen, danken.

Des Weiteren möchte ich Prof. Dr. Christine Spitzweg für die ausgezeichnete Mitbetreuung, für die Bereitstellung des Equipments und der Infrastruktur, für die vielen interessanten Diskussionen der Ergebnisse, für die Möglichkeit, die Projekte auf nationalen und internationalen Kongressen präsentieren zu dürfen und für die großartige Unterstützung in allen Belangen, danken.

Ein herzliches Dankeschön an Katy Schmohl, Nathalie Schwenk, Christina Schug, Sarah Urnauer, Mariella Tutter, Kerstin Knoop, Geoffrey Grünwald und Katja Gast aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Christine Spitzweg für die tolle Unterstützung zu jeder Tages- und Nachtzeit, für die vielen aufmunternden Worte, wenn alles mal nicht so lief, wie es sollte und für die vielen lustigen Stunden. Es war eine unvergesslich tolle Zeit mit euch.

Ein großes Dankeschön an Svenja Rühland, Alexandra Wechselberger, Carsten Jäckel, Nicole Salb, Moni Hofstetter, Anna Hagenhoff und Anke Fischer aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Peter Nelson für die tolle Unterstützung mit Wort und Tat, für die vielen netten Gespräche und die hervorragende Zusammenarbeit.

Besonderer Dank an Rosel Oos, Karin Bormann-Giglmaier, Dr. Barbara von Ungern-Sternberg, Dr. Janette Carlsen, Dr. Roswitha Beck, Dr. Andreas Delker, Dr. Christian Zach, Dr. Franz Josef Gildehaus, Dr. Andrei Todica, Dr. Markus Strigl, Prof. Dr. Peter Bartenstein und allen weiteren Mitarbeitern der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin des Klinikums der Universität München, Dr. Alexander Ruffani von der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin des Klinikums rechts der Isar, Prof. Dr. Dirk-André Clevert und Dr. Michael Ingrisch vom Institut für Klinische Radiologie des Klinikums der Universität München und PD Dr. Hanno Nieß von der Klinik für Allgemein-, Viszeral-, Gefäß- und Transplantationschirurgie des Klinikums der Universität München für die große Unterstützung bei den Arbeiten mit den Mäusen, für die Bereitstellung des Tierhauses, für die Synthese des ^{18}F -TFB und des $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Pertechnetat und für die fachliche Unterstützung.

Besten Dank an Eva Kessel, Markus Kovac und Prof. Dr. Ernst Wagner von der Fakultät für Chemie und Pharmazie der LMU München für die fachliche Unterstützung und die Bereitstellung des Tierhauses.

Vielen Dank an Prof. Dr. Doris Mayr vom Institut für Pathologie der LMU München und Dan Draganovici von der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV der LMU München für die Hilfe bei der Aufarbeitung der Mausorgane.

Herzlichen Dank an Dr. Annette Feuchtinger vom Helmholtz-Zentrum München für die 3D-Lichtblattfluoreszenzmikroskopie.

Besten Dank an Dr. Heike Heuer vom Leibniz-Institut für umweltmedizinische Forschung, Prof. Dr. Josef Köhrle und Dr. Eddy Rijntjes vom Institut für Experimentelle Endokrinologie an der Charité-Universitätsmedizin Berlin für die fachliche Unterstützung bei der Entwicklung eines Protokolls zur Radioiodablation der Mausschilddrüse und für die T3/T4 Messungen im Mausblut/Mausserum.

Vielen Dank an die DFG für die finanzielle Unterstützung und den SPP1629 für die vielen inspirierenden Gespräche und Diskussionen während der regelmäßigen Treffen.

Zuletzt möchte ich noch meiner Familie, meinen Freunden und besonders meinem Freund Patrick für die großartige Unterstützung auf jede erdenkliche Weise, für die vielen aufbauenden Worte, die immer offenen Ohren und für so vieles mehr von ganzem Herzen danken.

8 Eidesstattliche Versicherung

Müller, Andrea Maria

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Charakterisierung von Hypoxie-responsiven mesenchymalen Stammzellen unter Verwendung des Natrium-Iodid-Symporters als Reporter- und Therapiegen

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Freising,

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin